

**ANÁLISIS MOLECULAR,
MODIFICACIÓN FUNCIONAL Y
PRODUCCIÓN DE ENZIMAS
SUSCEPTIBLES DE SER
UTILIZADAS EN LA SÍNTESIS
DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS**

Tesis Doctoral presentada por
Alvaro Lafraya Aguado
Valencia, 2011



**ANÁLISIS MOLECULAR, MODIFICACIÓN FUNCIONAL
Y PRODUCCIÓN DE ENZIMAS SUSCEPTIBLES DE SER
UTILIZADAS EN LA SÍNTESIS DE
FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS**

Tesis Doctoral presentada por:

Alvaro Lafraya Aguado

Valencia, 2011



Los Doctores Julio Polaina Molina y Julia Marín Navarro pertenecientes al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, hacen constar que:

La Tesis Doctoral titulada **“Análisis molecular, modificación funcional y producción de enzimas susceptibles de ser utilizadas en la síntesis de fructooligosacáridos”**, presentada por Don Alvaro Lafraya Aguado para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia, ha sido realizada en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) bajo su dirección, y que reúne los requisitos legales establecidos para ser defendida por su autor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente documento en Paterna, a 12 de mayo de 2011.

Fdo. Dr. Julio Polaina Molina

Fdo. Dra. Julia Marín Navarro

A mis padres.

A mi hermano.

Quien tropieza y no cae, dos pasos adelante.

Agradecimientos

He estado bastante tiempo pensando si escribir o no agradecimientos, porque no me veía escribiéndolos, pero bueno, al final la verdad es que creo que he acertado. No soy una persona que exteriorice mucho sus sentimientos, por lo que esta es una oportunidad perfecta para hacerlo.

Por donde empezar cuando quieres agradecer todo lo que he aprendido y vivido durante estos años en el IATA..., no es fácil, por eso, voy a empezar dándole las gracias a la persona que me permitió tener esta oportunidad, al Dr. Julio Polaina, que tuvo los medios y la paciencia suficiente como para que haya podido terminar la tesis saltando de contrato en contrato, y también como no, por todo lo que he aprendido de él.

A Julia también tengo mucho que agradecerle, ya que ha sido la persona que ha tenido que aguantar mis cabezonerías y mis malas caras cuando teníamos que corregir la tesis, y también, porque hay que reconocerlo, es muy buena en lo que hace; he aprendido mucho de ella y tras su llegada al laboratorio todo me ha sido mucho más sencillo.

Al Profesor Lucas del Castillo, compañero de pesca, que con su cercanía y amabilidad siempre estaba dando buenas ideas para los experimentos, dispuesto a echar una mano, y a hacer los southernns que hicieran falta. También recordaré cuando nos invitaba en fechas señaladas a una chocolatá con esos buñuelos tan ricos de higo y calabaza.

Quiero agradecer también su apoyo y ánimo a todos aquellos que están o han pasado por el laboratorio de Estructura y Función de Enzimas del IATA, ya que con ellos he vivido el día a día, he aprendido, me han dado consejos y también conversación, cuando me veían que estaba demasiado “en el otro mundo”, ¿Verdad Lola?

Asimismo, tengo que recordar a la Dra. Julia Sanz, que me permitió tener una idea más cercana de lo que es la resolución cristalográfica de proteínas en esas dos miniestancias que hice en su laboratorio y al Dr. Luis Cañas por su ayuda con las fotos de microscopía electrónica que hicimos de la levadura.

También tengo que recordar a la gente del IATA, a los compañeros del tranvía que hacían mas llevadero el camino, y todas las personas que de un modo u

otro he conocido en los pasillos, los almuerzos, las comidas y demás eventos que, a pesar de mi mala memoria, siempre recordaré.

Tantos años en Valencia también me han servido para conocer mucha gente tanto de dentro como fuera del IATA, que han terminado siendo mis amigos y que han sido un gran punto de apoyo para no perder de vista “la otra vida”. Siempre es importante tener a alguien con quien poder charlar, echar un futbito, squash, padel, voley, una carrera de cars o preparar una paella a leña, jugar a las palas o a la cometa en la playa, o ir al cine, pescar, irte de viaje, de senderismo o simplemente quedar un rato a tomar algo por el Carmen.

Tampoco quiero olvidar a mis amigos de “la cuadrilla” del pueblo, el Katxi, que a pesar de estar lejos y vernos muy de vez en cuando, me acuerdo mucho de ellos y siempre los tengo presente.

Por último quiero dar las gracias a mis padres y a mi hermano, ya que han sido ellos los que me han permitido llegar hasta aquí, con su apoyo, comprensión y dedicación. Que sepáis que a pesar de lo poco que os llamo, siempre estais en mi corazón y mis pensamientos.

A toda la gente que me he encontrado a lo largo de este camino, que parecía nunca iba a terminar. Muchas gracias por todo y que sepáis que ha sido un placer conocerlos, y espero que podamos mantener el contacto a pesar de los devenires de nuestras vidas.

Pero bueno, todo llega, y esta tesis es un ejemplo de que, como se suele decir, con paciencia no hay nada que no se pueda conseguir.

Índice General

ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XV
INTRODUCCIÓN	1
1- ALIMENTO FUNCIONAL	3
1.1 Fibra dietética y prebióticos.....	3
2- FRUCTANOS.....	6
2.1 Inulina.....	8
2.2 Fructooligosacáridos	10
3- PROPIEDADES NUTRICIONALES DE LA INULINA Y LOS FOS	13
3.1 Propiedades beneficiosas en el intestino grueso	13
3.2 Regularización del metabolismo lipídico	18
3.3 Reducción del riesgo de padecer enfermedades	19
3.4 Fórmulas infantiles	20
4- OTRAS PROPIEDADES Y APLICACIONES DE LOS FOS	21
5- PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE FOS.....	22
5.1 Hidrólisis de inulina.....	22
5.2 Síntesis enzimática.....	23
6- MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ENZIMAS UTILIZABLES PARA LA PRODUCCIÓN DE FOS.....	24
7- ENZIMAS QUE CATALIZAN LA SÍNTESIS DE FOS	26
7.1 Familia GH32.....	28
7.2 Mecanismo de reacción de enzimas hidrolíticas y transfructosilantes	32
8- INVERTASA (SUC2) DE <i>S. cerevisiae</i>	36

OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1- MATERIAL BIOLÓGICO, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	45
1.1 Estirpes microbianas.....	45
1.2 Cultivo de levaduras.....	46
1.3 Cultivo de <i>E. coli</i>	47
2- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA	47
2.1 Tratamientos enzimáticos del DNA.....	47
2.2 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	48
2.3 Vectores utilizados	49
2.4 Aislamiento de DNA plasmídico a partir de <i>E. coli</i>	49
2.5 Aislamiento de DNA genómico de levadura.....	50
2.6 Amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	50
2.7 Plásmidos construidos	60
2.8 Análisis de secuencias.....	68
3- RASTREO DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE INVERTASAS E INULINASAS	68
4- CITOMETRÍA DE FLUJO	69
5- ANÁLISIS DE LA ESPORULACIÓN.....	70
6- EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN <i>E. coli</i>	70
7- MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	71
7.1 Purificación de proteínas.....	71
7.2 Cromatografía de exclusión molecular.....	72
8- ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA INVERTASA....	72
8.1 Ensayo de liberación de glucosa	72

8.2 Determinación de actividad transfructosilante.....	73
9- ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS E INMUNODETECCIÓN ..	74
9.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	74
9.2 Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa e inmunodetección	75
10- ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS.....	75
10.1 Modelización estructural.....	75
10.2 Cristalización de proteínas	76
RESULTADOS	77
1- CARACTERIZACIÓN DE <i>Wickerhamomyces onychis</i> Y <i>Wickerhamomyces navarrensis</i> sp. nov	79
1.1 Rastreo e identificación de microorganismos productores de invertasas e inulinasas	79
1.2 Caracterización filogenética	80
1.3 Estudio cromosómico y contenido de DNA	86
1.4 Caracterización morfológica y citológica	88
1.5 Análisis de la capacidad de esporulación.....	91
1.6 Caracterización bioquímica	93
1.7 Análisis de la capacidad transfructosilante de <i>W. navarrensis</i> .	95
1.8 Estudio de la invertasa de <i>W. navarrensis</i> sp. nov.....	96
2- ANÁLISIS BIOQUÍMICO E INGENIERÍA MOLECULAR DE LA INVERTASA SUC2 DE <i>S. cerevisiae</i>	97
2.1 Análisis estructural	97
2.2 Expresión de Suc2 en <i>E. coli</i> y cristalización de la proteína purificada	100
2.3 Estudio funcional del dominio Carboxi-terminal	103
2.4 Análisis de la estructura cuaternaria de Suc2	104

2.5 Estudio comparativo de la actividad transfructosilante de Suc2 frente a otras enzimas de la familia GH32	105
2.6 Mejora de la actividad transfructosilante de Suc2.....	108
2.7 Optimización de las condiciones de temperatura y pH de la reacción transfructosilante	133
2.8 Análisis cinético de los mutantes con mejores propiedades de transfructosilación	137
DISCUSIÓN	141
1- CARACTERIZACIÓN DE <i>Wickerhamomyces onychis</i> Y <i>Wickerhamomyces navarrensis</i> sp. nov	143
2- ANÁLISIS BIOQUÍMICO E INGENIERÍA MOLECULAR DE LA INVERTASA Suc2 DE <i>S. cerevisiae</i>	147
2.1 Análisis estructural de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i>	147
2.2 Estudio comparativo de la actividad transfructosilante de Suc2 frente a otras enzimas de la familia GH32	152
2.3 Determinantes para la mejora de la capacidad transfructosilante de Suc2: discriminación del aceptor del grupo fructosilo	152
2.4 Determinantes de la especificidad del producto de transfructosilación: orientación de la molécula aceptora	157
2.5 Características cinéticas de los mutantes con mejor actividad transfructosilante.....	160
2.6 Aplicaciones biotecnológicas y perspectivas futuras	162
CONCLUSIONES	165
BIBLIOGRAFÍA	169
APÉNDICE	
Tabla de los 20 aminoácidos esenciales donde se representa su estructura química.....	193

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes tipos de fructanos prebióticos en función del grado de polimerización y del tipo de enlace glicosídico.	7
Figura 2. Cromatograma de la inulina nativa de la achicoria obtenido mediante una columna de intercambio aniónico en un equipo DIONEX	9
Figura 3. Varios productos comerciales que contienen FOS	12
Figura 4. Microbiota intestinal humana y posibles efectos para la salud.	14
Figura 5. Destino metabólico de los prebióticos tipo inulina.....	15
Figura 6. Clasificación en clanes de las familias de las GH según su plegamiento estructural.....	26
Figura 7. Representación del dominio catalítico β -propeller y β -sándwich de la invertasa (PDB 2AC1) de <i>A. thaliana</i> (GH32). y dominio catalítico de la levansucrasa (PDB 1OYG) de <i>B. subtilis</i> (GH68).....	27
Figura 8. Árbol filogenético de diferentes enzimas de la familia GH32 procedentes de bacterias, hongos o plantas	29
Figura 9. Localización de los residuos que forman el bolsillo hidrofóbico y la tríada catalítica de la exo-inulinasa (1Y4W) de <i>A. awamori</i> y de la invertasa (2AC1) de <i>A. thaliana</i>	30
Figura 10. Primera etapa en la reacción enzimática de hidrolasas y fructosil-transferasas.....	32
Figura 11. Segunda etapa en la reacción enzimática de hidrolasas y fructosil-transferasas.....	33
Figura 12. Segunda etapa de la reacción transfructosilante y formación de diferentes FOS en función del sustrato aceptor.....	34
Figura 13. Estructura primaria de la invertasa de <i>S. cerevisiae</i>	38
Figura 14. Vectores utilizados en este trabajo	49
Figura 15. Diseño de cebadores degenerados a partir de alineamientos de secuencias de genes de la familia GH32.....	54

Figura 16. Diseño de cebadores degenerados a partir de alineamientos de secuencias de genes <i>URA3</i>	55
Figura 17. Esquema del gen de la invertasa de <i>W. navarrensis</i>	56
Figura 18. Esquema del gen <i>URA3</i> de <i>W. navarrensis</i>	56
Figura 19. Esquema de la técnica de “Genome Walking”	57
Figura 20. Esquema del proceso de mutagénesis dirigida	59
Figura 21. Esquema que se siguió para el aislamiento de levaduras a partir de tierra asociada a raíces de <i>Allium sativum</i> y <i>Allium cepa</i>	69
Figura 22. Método utilizado para la purificación de proteínas en el equipo AKTA-purifier	71
Figura 23. Esquema representativo de las reacciones de hidrólisis y transfructosilación catalizadas por invertasas de la familia GH32.....	73
Figura 24. Árbol filogenético de diferentes géneros y especies de levaduras incluyendo a <i>W. navarrensis</i> y <i>W. onychis</i> en base a su rDNA D1/D2	83
Figura 25. Árbol filogenético de diferentes géneros y especies de levaduras incluyendo a <i>W. navarrensis</i> y <i>W. onychis</i> en base a su rDNA ITS1-5.8S-ITS2.....	84
Figura 26. Árbol filogenético de diferentes géneros y especies de levaduras incluyendo a <i>W. navarrensis</i> y <i>W. onychis</i> en base a su gen <i>URA3</i>	86
Figura 27. Cariotipo analizado mediante CHEF de varios clones de <i>W. onychis</i> y <i>W. navarrensis</i>	87
Figura 28. Análisis de ploidía de <i>W. navarrensis</i> y <i>W. onychis</i> mediante citometría de flujo	88
Figura 29. Crecimiento colonial de <i>W. navarrensis</i> y <i>W. onychis</i> en medio SPIDER durante 72 h a 30°C	89
Figura 30. Aspecto colonial de <i>W. navarrensis</i> y <i>W. onychis</i> crecidas en medio completo con celobiosa como fuente de carbono (YPcel) durante 72 h a 30°C	89

Figura 31. Morfología y tamaño celular observable al microscopio óptico (40x), de <i>W. navarrensis</i> y <i>W. onychis</i> cultivadas en medio completo con celobiosa como fuente de carbono (YPcel) durante 72 h a 30°C	90
Figura 32. Aspecto de <i>W. navarrensis</i> al microscopio electrónico a partir de un cultivo crecido en YPD durante 12 h a 30°C	90
Figura 33. Imágenes de células esporuladas de <i>W. onychis</i> tomadas por microscopía óptica en campo claro con objetivo 100X	91
Figura 34. Imágenes de células esporuladas de <i>W. navarrensis</i> tomadas por microscopía óptica en campo claro con objetivo 100X	92
Figura 35. Crecimiento de <i>W. navarrensis</i> y <i>W. onychis</i> en medio mínimo con D-Celobiosa como fuente de carbono (SCel)	95
Figura 36. Cromatograma de los productos de transfructosilación tras incubar 0.03 U/ml del sobrenadante del cultivo de <i>W. navarrensis</i> con sacarosa 1.75 M, durante 24 h a 50°C	96
Figura 37. Estructura primaria de la invertasa de <i>W. navarrensis</i>	97
Figura 38. Alineamiento estructural entre las invertasas de <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. occidentalis</i> obtenido por el programa I-TASSER	98
Figura 39. Modelo estructural de la invertasa de <i>S. cerevisiae</i> (Suc2)	99
Figura 40. Centro catalítico de la invertasa de <i>S. cerevisiae</i>	100
Figura 41. Expresión y purificación de Suc2 en <i>E. coli</i>	102
Figura 42. Cristales de la invertasa de <i>S. cerevisiae</i>	103
Figura 43. Cromatograma obtenido por exclusion molecular de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i>	104
Figura 44. Expresión del gen <i>INV</i> de <i>W. navarrensis</i> , <i>INU</i> de <i>K. marxianus</i> , <i>INU1</i> de <i>A. niger</i> , mutante Suc2 D22N y Suc2 wt de <i>S. cerevisiae</i> en <i>E. coli</i>	106
Figura 45. Cromatograma de los productos de transfructosilación de diferentes enzimas de la familia GH32	107
Figura 46. Alineamiento de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i> y la 1-SST de <i>A. foetidus</i> (O42801)	109

Figura 47. Vista ampliada del centro activo de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i>	110
Figura 48. Análisis por SDS-PAGE de la producción de Suc2, Suc2 GVW, Suc2 VVV y Suc2 GVW/VVV a partir de extractos celulares de <i>E. coli</i>	111
Figura 49. Producción de distintos azúcares tras la incubación de la enzima nativa y los mutantes Suc2-GVW y Suc2-VVV	112
Figura 50. Alineamiento de la secuencia polipeptídica de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i> junto con diferentes invertasas y transferasas de plantas en el entorno del motivo WMNDPNG	113
Figura 51. Alineamiento de la secuencia polipeptídica de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i> junto con enzimas vegetales de la familia GH32 alrededor del motivo W[G/S][W/Y].....	114
Figura 52. Superposición del modelo de la invertasa Suc2 con la estructura resuelta de la invertasa de <i>A. thaliana</i> (PDB 2AC1).....	114
Figura 53. Visualización del denominado bolsillo hidrofóbico de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i>	115
Figura 54. Alineamiento de la secuencia polipeptídica de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i> junto con enzimas del clan GH-J	115
Figura 55. Vista ampliada del centro activo de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i> nativa, Suc2 W19Y, Suc2 F82W, Suc2 W287Y, Suc2 W291Y y Suc2 WGY	116
Figura 56. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de Suc2, Suc2 W19Y, Suc2 F82W, Suc2 W287Y, Suc2 W291Y y Suc2 WGY en <i>E. coli</i>	117
Figura 57. Producción de distintos azúcares tras la incubación de la enzima nativa y los mutantes W19Y, W287Y, W291Y y F82W.....	118
Figura 58. Alineamiento de la secuencia polipeptídica de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i> junto con diferentes invertasas y transferasas de plantas	119
Figura 59. Vista ampliada del centro activo de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i> nativa, Suc2 N21S, Suc2 N24S, Suc2 W19Y/N21S, Suc2 W19Y/N24S y Suc2 W19Y/N21S/N24S	120

Figura 60. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de Suc2, Suc2 N21S, Suc2 N24S, Suc2 W19Y/N21S, Suc2 W19Y/N24S y Suc2 W19Y/N21S/N24S en <i>E. coli</i>	121
Figura 61. Producción de distintos azúcares tras la incubación de la enzima nativa y los mutantes Suc2 N21S, Suc2 N24S, Suc2 W19Y/N21S, Suc2 W19Y/N24S y Suc2 W19Y/N21S/N24S	122
Figura 62. Alineamiento de la secuencia polipeptídica de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i> junto con diferentes invertasas extracelulares, invertasas vacuolares y transferasas de plantas	124
Figura 63. Vista ampliada del centro activo de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i> nativa, Suc2 P205V y Suc2 W19Y/N21S/P205V	124
Figura 64. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de Suc2, Suc2 P205V y Suc2 W19Y/N21S/P205V en <i>E. coli</i>	125
Figura 65. Producción de distintos azúcares tras la incubación de la enzima nativa y los mutantes Suc2-W19Y/N21S, Suc2-P205V y Suc2-P205V/W19Y/N21S	126
Figura 66. Acoplamiento “docking” de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i> con el trisacárido 6-kestosa	128
Figura 67. Vista ampliada del centro activo de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i> nativa, Suc2 N228R, Suc2 N228A, Suc2 N21S/N228R y N21S/N228A	129
Figura 68. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de Suc2, Suc2 N228R, Suc2 N228A, Suc2 N228R/N21S y Suc2 N228A/N21S en <i>E. coli</i>	130
Figura 69. Producción de distintos azúcares tras la incubación de la enzima nativa y los mutantes Suc2-N21S, Suc2-N228R, Suc2-N228A, Suc2-N228R/N21S y Suc2-N228A/N21S.....	131
Figura 70. Producción de distintos azúcares tras la incubación de 0.15 U/ml de la enzima nativa y los mutantes W19Y/N21S y P205V con sacarosa (1.75 M) en tampón acetato durante 24 h a tres temperaturas 40, 50 y 60°C	134
Figura 71. Producción de distintos azúcares tras la incubación de 0.15 U de la enzima nativa y los mutantes W19Y/N21S y P205V con sacarosa (1.75 M) durante 24 h en tampón acetato con tres pH 3.8, 4.8 y 5.7	136

Figura 72. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la velocidad inicial (v_0) de reacción de la invertasa wt y los mutantes a 50°C y pH 4.8 ..	138
Figura 73. Cinética de liberación de glucosa y de síntesis-degradación de FOS por la invertasa Suc2 y los mutantes seleccionados. Se incubaron 0.6 U/ml de cada una de las enzimas con sacarosa 1.75 M a 50°C y pH 4.8...	139
Figura 74. Estructura del DNA ribosomal nuclear	143
Figura 75. Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias del dominio D1/D2 de cepas de levadura clasificadas como <i>W. onychis</i> en el GenBank junto con las de <i>W. navarrensis</i> y <i>W. onychis</i> obtenidas en este trabajo.....	145
Figura 76. Superposición del modelo estructural de Suc2, con las estructuras tridimensionales resueltas de la invertasa de <i>A. thaliana</i> y la fructosiltransferasa de <i>A. japonicus</i>	148
Figura 77. Red de puentes de hidrógeno involucrados en la capacidad hidrolítica/transfructosilante en el entorno del residuo nucleófilo	155
Figura 78. Puente de hidrógeno entre el Asp151 y la Cys204 en la enzima nativa Suc2	157
Figura 79. Acoplamiento “docking” del modelo estructural de la invertasa Suc2 de <i>S. cerevisiae</i> con el trisacárido 6-kestosa. Están señalados los residuos catalíticos, el Trp291, así como la Asn228	159
Figura 80. Superposición del modelo de la invertasa Suc2, con la estructura resuelta de la levansucrasa SacB de <i>B. subtilis</i>	159

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligosacáridos prebióticos o con posible actividad prebiótica	5
Tabla 2. Contenido en inulina de diferentes plantas comestibles	9
Tabla 3. FOS obtenidos enzimáticamente a partir de sacarosa. Continúa en la página siguiente.	10
Tabla 4. Otras aplicaciones de los FOS en la industria alimentaria y farmacéutica.	21
Tabla 5. Fuentes bacterianas, fúngicas y vegetales de enzimas que sintetizan FOS	25
Tabla 6. Enzimas de la familia GH32 y GH68	27
Tabla 7. Estructuras resueltas de enzimas pertenecientes a la familia GH32.....	31
Tabla 8. FOS sintetizados en función de la molécula aceptora del grupo fructosilo y del grupo hidroxilo que se desprotona.....	34
Tabla 9. Hongos y levaduras utilizados en este trabajo	45
Tabla 10. Bacterias (<i>E. coli</i>) utilizadas en este trabajo	45
Tabla 11. Cebadores utilizados en este trabajo.....	50
Tabla 12. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	60
Tabla 13. Programa utilizado para la separación cromatográfica de mono, di y oligosacáridos en el DIONEX HPAEC-PAD	74
Tabla 14. Identidad de secuencias del rDNA 5.8S de levaduras aisladas a partir de tierra asociada a raíces de ajo y cebolla	80
Tabla 15. Divergencias a nivel nucleotídico en la región D1/D2 del gen 26S del rDNA	81
Tabla 16. Códigos de acceso y descripción en la base de datos GenBank del rDNA de <i>W. navarrensis</i> y <i>W. onychis</i>	82
Tabla 17. Divergencias a nivel nucleotídico en la región ITS1, ITS2 e ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA	82

Tabla 18. Número de acceso en el GenBank de los genes <i>URA3</i> de <i>W. navarrensis</i> y <i>W. onychis</i>	85
Tabla 19. Diferencias a nivel nucleotídico y aminoacídico del <i>URA3</i> entre <i>W. navarrensis</i> y <i>W. onychis</i>	85
Tabla 20. Ensayos de actividad enzimática de <i>W. navarrensis</i> y <i>W. onychis</i>	93
Tabla 21. Asimilación de diferentes sustratos por <i>W. navarrensis</i> y <i>W. onychis</i>	94
Tabla 22. Actividad invertasa (μmol glucosa/(min·ml ex)) en el extracto soluble de los transformantes medida a 50°C y pH 4.8 frente a sacarosa 1.75 M.....	106
Tabla 23. Porcentajes de producción de glucosa, fructosa, 1-kestosa y 6-kestosa así como la relación glucosa/fructosa de las cuatro enzimas respecto al total de azúcares de la mezcla	108
Tabla 24. Grado medio de hidrofobicidad (GRAVY) de las zonas GVW y VVV de la invertasa de <i>S. cerevisiae</i> y de la 1-SST de <i>A. foetidus</i>	109
Tabla 25. Actividad invertasa (μmol glucosa/(min·ml ex)) en el extracto soluble de los transformantes de la invertasa Suc2 nativa y de los mutantes medida a 50°C y pH 4.8 frente a sacarosa 1.75 M.....	111
Tabla 26. Actividad invertasa (μmol glucosa/(min·ml ex)) en el extracto soluble de los transformantes de la invertasa Suc2 nativa y de los mutantes medida a 50°C y pH 4.8 frente a sacarosa 1.75 M.....	117
Tabla 27. Actividad invertasa (μmol glucosa/(min·ml ex)) en el extracto soluble de los transformantes de la invertasa Suc2 nativa y de los mutantes medida a 50°C y pH 4.8 frente a sacarosa 1.75 M.....	122
Tabla 28. Porcentajes de producción de glucosa, fructosa, 1-kestosa y 6-kestosa, respecto al total de azúcares. Se indica también el ratio molar glucosa/fructosa de la enzima Suc2 nativa (wt) y de las mutantes analizadas por Dionex	123
Tabla 29. Actividad invertasa (μmol glucosa/(min·ml ex)) en el extracto soluble de los transformantes de la invertasa Suc2 nativa y de los mutantes medida a 50°C y pH 4.8 frente a sacarosa 1.75 M.....	125

Tabla 30. Porcentajes de producción de glucosa, fructosa, 1-kestosa y 6-kestosa respecto al total de azúcares. Se indica también el ratio molar glucosa/fructosa de la enzima Suc2 nativa y de las mutantes analizadas por Dionex.....	127
Tabla 31. Actividad invertasa (μmol glucosa/(min·ml ex)) en el extracto soluble de los transformantes de la invertasa Suc2 nativa y de los mutantes medida a 50°C y pH 4.8 frente a sacarosa 1.75 M	130
Tabla 32. Porcentajes de producción de glucosa, fructosa, 1-kestosa y 6-kestosa respecto al total de azúcares. Se indica también el ratio molar glucosa/fructosa de la enzima Suc2 nativa y de las mutantes analizadas por Dionex.....	131
Tabla 33. Comparativa entre la invertasa Suc2 wt y los mutantes realizados en este trabajo en relación a la actividad específica, el ratio molar glucosa/fructosa y el porcentaje de producción de 1-kestosa y 6-kestosa respecto al total de azúcares de la mezcla	132
Tabla 34 Comparativa entre la invertasa Suc2 wt de <i>S. cerevisiae</i> y los mutantes W19Y/N21S y P205V en relación al ratio Glucosa/Fructosa y al porcentaje de producción de 6-kestosa en función de la temperatura utilizada en la reacción.....	133
Tabla 35. Comparativa entre la invertasa Suc2 wt de <i>S. cerevisiae</i> y los mutantes W19Y/N21S y P205V en relación al ratio Glucosa/Fructosa y al porcentaje de producción de 6-kestosa en función del pH utilizado en la reacción	135
Tabla 36. Valores de k_{cat} y K_m de la invertasa wt y los mutantes.....	138
Tabla 37. Relación entre secuencias del dominio D1/D2 de cepas de levadura clasificadas como <i>W. onychis</i> en el GenBank junto con la de <i>W. navarrensis</i> en relación a la secuencia D1/D2 de <i>W. onychis</i> obtenidas en este trabajo	146
Tabla 38. Residuos que forman puentes de H con el sustrato en el modelo estructural de Suc2 junto con sus homólogos en diferentes enzimas de la misma familia resueltas estructuralmente.....	149
Tabla 39. Residuos que forman puentes de H en la superficie de contacto entre subunidades que forman el dímero de la invertasa de <i>S. occidentalis</i> y sus homólogos en Suc2.....	151

Tabla 40. Residuos homólogos de Suc2 y otras enzimas de la familia GH32 y GH68 que forman parte del bolsillo hidrofóbico que rodea al sustrato	155
Tabla 41. Valores de k_{cat} y K_m para la sacarosa de diferentes invertasas y de sus mutantes	161

ABREVIATURAS

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Programa que permite el alineamiento con secuencias homólogas publicadas.

CAZY: carbohydrate Active enZYmes. Servidor especializado en el estudio de enzimas que degradan, modifican o forman enlaces glicosídicos.

CD: Catalytic Domain (dominio catalítico).

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

DO: Densidad óptica

DP: grado de polimerización

EC number: Enzyme Commission number

EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal

FOS: Fructooligosacáridos

GH: Glicosil Hidrolasa

GLP-1: Glucagon-like peptide-1

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

LB: Medio de Lauria-Bertani para el crecimiento de bacterias.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

PDB: Protein Data Bank. Web que contiene información relativa a estructuras resueltas experimentalmente de proteínas y ácidos nucleicos.

rDNA: DNA ribosómico

RMSD: Root Mean Square Deviation. (desviación del valor cuadrático medio). La RMSD de estructuras alineadas indica las divergencias entre ellas.

TCEP: 1,2,3-tris(2-cianoetoxi)propano

TG: Triglicéridos

TGI Tracto gastrointestinal

UFC: Unidades formadoras de colonia

URA3: Gen que codifica la enzima orotidina-5'-fosfato decarboxilasa

INTRODUCCIÓN

1 ALIMENTO FUNCIONAL

Según diversos estudios epidemiológicos, la alimentación juega un papel determinante en la salud humana. Una dieta rica en frutas y verduras junto con una baja ingesta de grasas se ha correlacionado con una reducción en la incidencia de cáncer de colon y de enfermedades cardiovasculares, que son las denominadas enfermedades de occidente (Blaut 2002, Trock et al. 1990). El diseño de alimentos con efectos beneficiosos para la salud se ha convertido en los últimos años en un concepto muy importante en la industria alimentaria, debido a la demanda creciente por parte del consumidor de este tipo de productos, a los que se han denominado “alimentos funcionales”. Un alimento puede considerarse funcional si se ha demostrado de modo satisfactorio que afecta de forma beneficiosa a una o más funciones clave en el organismo, más allá de los efectos nutricionales, de modo que sea relevante tanto para mejorar el estado de salud y bienestar como para reducir el riesgo de enfermedad. Un alimento funcional debe seguir siendo un alimento y debe además demostrar sus efectos en las cantidades en que normalmente se espere sea consumido en la dieta: no es una píldora o cápsula, sino que es parte del patrón alimentario habitual (Diplock AT et al. 1999). Muchos de los alimentos funcionales que se comercializan hoy en día presentan en su composición ingredientes denominados prebióticos.

1.1 Fibra dietética y prebióticos

La fibra dietética es el conjunto de compuestos que no son digeridos en el intestino delgado y que llegan al colon intactos. Se puede dividir en 1) soluble (fermentativa) que incluye polisacáridos como almidón resistente, pectinas, inulina, goma guar y oligosacáridos y 2) insoluble (no fermentativa), como la celulosa y la lignina (Blaut 2002, Potter et al. 1993).

Los prebióticos fueron definidos por Gibson y Roberfroid en 1995 como “ingredientes que no son hidrolizados por las enzimas intestinales y que ejercen un efecto positivo para la salud porque estimulan selectivamente el crecimiento o el metabolismo en el colon de determinados microorganismos de acción beneficiosa, mientras que inhiben el crecimiento de potenciales especies perjudiciales”. El concepto de prebiótico surgió a raíz de la observación de cómo la ingesta de inulina y fructooligosacáridos estimulaba el crecimiento de las bifidobacterias (Gibson et al. 1995, Kruse et al. 1999), las cuales, a su vez, se consideran beneficiosas para la salud y el

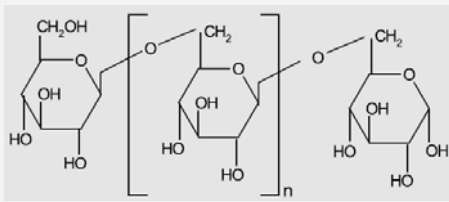
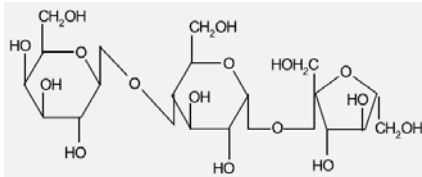
bienestar del ser humano (Gibson y Roberfroid 1995). Roberfroid actualizó la definición de prebiótico en 2007 como “un ingrediente fermentado selectivamente que provoca cambios específicos, tanto en la composición y/o actividad en la microflora intestinal, que confieren beneficios sobre la salud y el bienestar del huésped” (Roberfroid 2007b). Los prebióticos se incluyen en lo que se denomina fibra dietética soluble (Blaut 2002) ya que reúnen los 5 atributos que la definen: son carbohidratos (tanto oligo como polisacáridos), componentes de células vegetales comestibles, resistentes a la hidrólisis por las enzimas alimentarias humanas, no se absorben en el intestino delgado y son hidrolizadas y fermentadas (parcial o totalmente) por las bacterias del intestino grueso (Roberfroid 1993).

Roberfroid ha identificado dos grupos de compuestos nutricionales que entran en su definición de prebiótico atendiendo a su composición química: los prebióticos tipo inulina y los galactooligosacáridos (GOS) (Roberfroid 2007b). Los primeros representan el grupo de compuestos prebióticos más comercializados y son utilizados como ingredientes en alimentos funcionales como bebidas, yogures, galletas y patés, además de usarse como suplementos dietéticos (Kelly 2008). Los GOS se utilizan en la actualidad como ingrediente esencial en las formulas infantiles (Boehm et al. 2005, Fanaro et al. 2005).

Hay además otros muchos compuestos con cierto grado de actividad prebiótica aunque por el momento no hay datos lo suficientemente fiables como para incluirlos en la denominación de prebióticos estrictos (Roberfroid 2007b), a excepción de la lactulosa (Manning y Gibson 2004). En este grupo se incluyen mano-oligosacáridos, pectín-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos, oligosacáridos de soja (SOS), isomalto-oligosacáridos (IMO), xilo-oligosacáridos (XOS), gentio-oligosacáridos, N-acetilquito-oligosacáridos, oligosacáridos de melibiosa, gomas (como la goma Arabiga), sustratos ricos en hemicelulosa, almidón resistente, oligodextranos, polidextrosa, ácido glucónico, glutamina, lactosa, tagatosa y lactosucrosa (Blaut 2002, Calame et al. 2008, Collins y Rastall 2008, Roberfroid 2007b). En la Tabla 1 se muestran las estructuras de algunos de ellos.

Tabla 1. Oligosacáridos prebióticos o con posible actividad prebiótica.

OLIGOSACÁRIDO	ESTRUCTURA
Inulina	
GOS	
XOS	
IMO	
Lactulosa	

OLIGOSACÁRIDO	ESTRUCTURA
Gentio-oligosacáridos	
Lactosucrosa	

2 FRUCTANOS

Las moléculas con propiedades prebióticas más estudiadas son la inulina y los fructooligosacáridos. Ambas sustancias, junto con el levano, se incluyen en un grupo de compuestos denominados fructanos. Los fructanos son compuestos en los cuales los enlaces fructosil-fructosa son mayoritarios y pueden presentar una molécula de glucosa unida mediante enlace o-glicosídico en el extremo reductor. En concreto, la inulina es un material polidisperso donde todos o la mayoría de enlaces entre fructosas son β (2 \rightarrow 1). El levano se define como un material donde todos o la mayoría de enlaces entre fructosas son β (2 \rightarrow 6). Los fructooligosacáridos (FOS) pueden contener enlaces tipo inulina, tipo levano o ambos, y se definen por un bajo grado de polimerización (entre 3 y 5) (Figura 1).

Los fructanos son los carbohidratos no estructurales más abundantes en la naturaleza después del almidón. Están presentes en una gran variedad de plantas y en algunas bacterias funcionando principalmente como carbohidratos de reserva (Franck y de Leenheer 2005). La acumulación de fructanos por las plantas podría deberse a una adaptación evolutiva a la sequía. Las plantas con fructanos son especialmente abundantes en zonas donde las lluvias son muy escasas (Henry y Wallace 1993) llegando a acumularlos hasta más del 80% de su peso seco (Edelman y Jeeord 1968). Estos carbohidratos, a diferencia del almidón, son solubles en agua y por lo

tanto son osmóticamente activos. Simplemente cambiando el grado de polimerización de los fructanos en la vacuola, la planta puede cambiar el potencial osmótico de la célula sin alterar la cantidad total de carbohidratos (Vergauwen et al. 2000). Otra de las funciones que pueden tener los fructanos en las plantas sería mejorar la tolerancia a las bajas temperaturas a través de estabilización de membranas (Hincha et al. 2000).

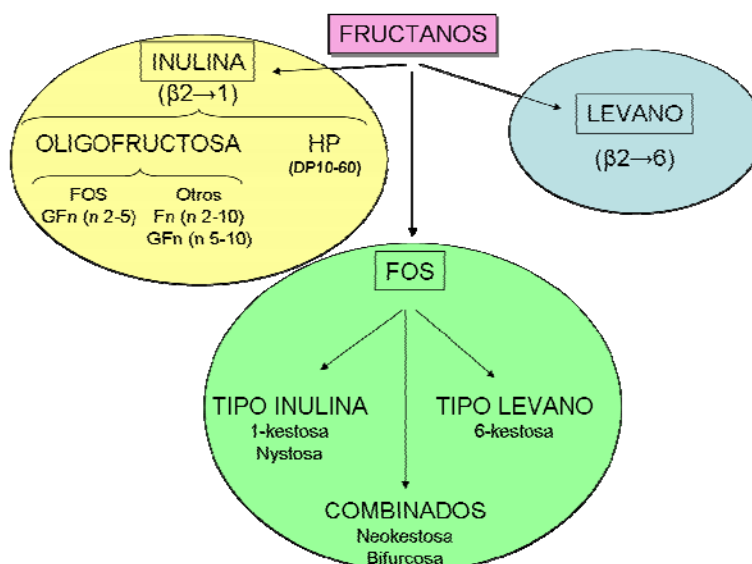


Figura 1. Diferentes tipos de fructanos prebióticos en función del grado de polimerización y del tipo de enlace glicosídico. Dentro del círculo verde se indican los FOS que pueden sintetizarse enzimáticamente a partir de sacarosa. DP es el grado de polimerización. GFn y Fn representan carbohidratos de oligofructosa con o sin una molécula de glucosa en su extremo no reductor respectivamente, siendo n el número de moléculas de fructosa.

Los fructanos prebióticos (inulina, levano y FOS) no son hidrolizados por las enzimas digestivas del intestino delgado del ser humano que carece de capacidad enzimática para hidrolizar moléculas unidas con enlaces β -glicosídicos (Roberfroid 2007a, Roberfroid y Slavin 2000). Por ello, han sido clasificados como “poli oligosacáridos no digeribles”. Los fructanos por tanto no se pueden absorber en el intestino delgado y llegan al intestino grueso donde son fermentados por determinadas bacterias anaerobias beneficiosas (bifidobacterias y lactobacilos) dotadas de hidrolasas que son capaces de

degradarlos y utilizarlos como fuente de carbono y energía. Como consecuencia de la fermentación por las bacterias, estos compuestos tienen un valor calórico de alrededor de 1.5-2 Kcal/g (Bornet et al. 2002). La ingesta diaria de FOS es difícil de estimar pero podría alcanzar los 3-13 g/día/persona (Delzenne 2003, Roberfroid 2005). La mayor parte de estudios nutricionales sobre las propiedades prebióticas de fructanos se han llevado a cabo con inulina, oligofructosa y FOS.

2.1 Inulina

La inulina es un polímero de fructosas con un grado de polimerización (DP) entre 2 y 100.000 que puede presentar o no una molécula de glucosa en su extremo reductor (inulina tipo GFn y Fn, respectivamente). Fue aislada por primera vez en 1804 por Rose a partir de un extracto de *Inula helenium* en agua hirviendo.

La inulina se encuentra en bacterias y plantas. Las plantas más habitualmente utilizadas en la alimentación humana que contienen inulina (Tabla 2) pertenecen tanto a la familia de las *Liliaceae* (puerro, ajo, cebolla y espárragos) como a la *Compositae* (alcachofa de Jerusalem, dalia, achicoria y yacón). La achicoria es actualmente la fuente principal de inulina a nivel industrial (Franck y de Leenheer 2005).

El grado de polimerización de la inulina y la presencia de ramificaciones, son propiedades importantes ya que determinan notablemente la funcionalidad de estos compuestos. La inulina de origen bacteriano tiene un DP entre 10.000 y 100.000, considerablemente superior si se compara con la de origen vegetal (DP < 200) y además está mucho más ramificada (>15%). El grado de polimerización de la inulina vegetal puede variar en función de la especie vegetal, el clima y la edad fisiológica de la planta. Así, la inulina nativa de la achicoria está compuesta por una mezcla de oligosacáridos con un grado de polimerización que oscila entre 2 y 65, con una DP media de 12 (Figura 2). La inulina vegetal en cambio, tiene un grado muy ligero de ramificación, de alrededor de un 1-2% (Steinbüchel 2002).

Dentro de la denominación de inulina (Figura 1) se puede distinguir entre:

- Inulina HP (o inulina de alto peso molecular) con un grado de polimerización entre 10 y 60 (DP medio de 25).

- Oligofructosa: mezcla de fructanos tipo inulina con un DP máximo de 10. Aquellos con un DP máximo de 5 se denominan FOS.

Tabla 2. Contenido en inulina de diferentes plantas comestibles (Van Loo et al. 1995).

Especie vegetal	Inulina (g/100 g base seca)
Pataca (<i>Helianthus tuberosus</i>)	89
Achicoria (<i>Cichorium intybus</i>)	79
Raíz de Dahlia (<i>Dahlia spp.</i>)	59
Cebolla (<i>Allium cepa</i> L.)	48
Ajoporro (<i>Allium porrum</i> L.)	37
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	29
Yacón (<i>smallanthus sonchifolius</i>)	27
Espárrago (<i>Asparagus officinalis</i> L.)	4
Cambur (<i>Musa cavendishii</i>)	2
Centeno (<i>Secale cereale</i>)	1

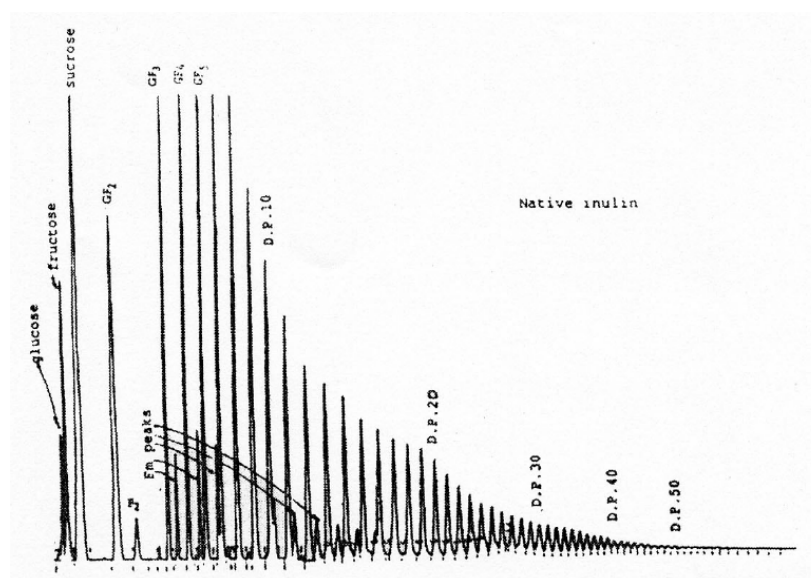


Figura 2. Cromatograma de la inulina nativa de la achicoria obtenido mediante una columna de intercambio aniónico en un equipo DIONEX.

2.2 Fructooligosacáridos

Las moléculas prebióticas líderes en el mercado alimentario europeo son los fructooligosacáridos (FOS) (Manning y Gibson 2004, Sangeetha et al. 2005). Son oligómeros compuestos en su mayoría por moléculas de fructosa unidas por enlaces β -glicosídicos, con una molécula de glucosa en su extremo reductor (Tabla 3). Se pueden obtener mediante hidrólisis de inulina o síntesis enzimática por invertasas o fructosil-transferasas a partir de sacarosa.

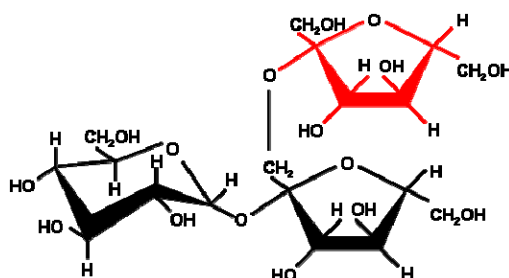
Tabla 3. FOS obtenidos enzimáticamente a partir de sacarosa. Continúa en la página siguiente.

1. FOS tipo inulina (enlaces β 2 \rightarrow 1)

1-Kestosa

1-Kestotriosa

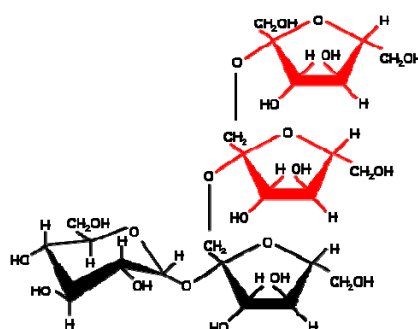
β -D-Fructofuranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fructofuranosil-(2 \rightarrow 1)- α -D-Glucopiranosido.



Nistosa

1,1-Kestotetraosa

β -D-Fructofuranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fructofuranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fructofuranosil-(2 \rightarrow 1)- α -D-Glucopiranosido.

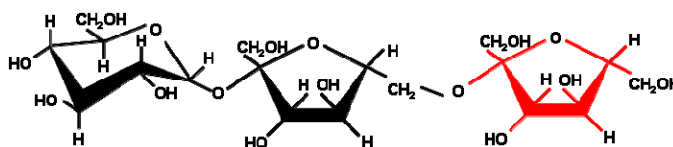


2. FOS tipo levano (enlaces β 2 \rightarrow 6)

6-Kestosa

6-Kestotriosa

β -D-Fructofuranosil-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fructofuranosil-(2 \rightarrow 1)- α -D-Glucopiranosido.

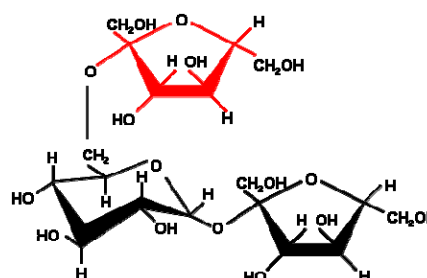


3. FOS combinados (enlaces β 2 \rightarrow 1 y β 2 \rightarrow 6)

Neokestosa

6_G-Kestotriosa

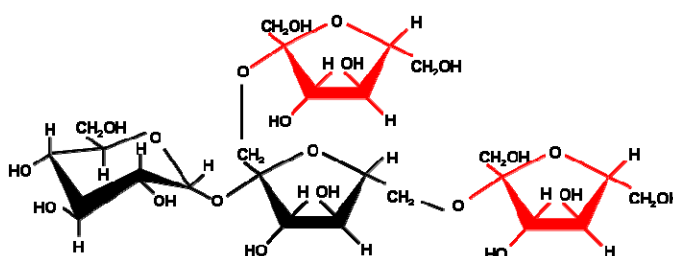
β -D-Fructofuranosil-(2 \rightarrow 6)- α -D-Glucopiranosil-(1 \leftrightarrow 2)- β -D-Fructofuranosido



Bifurcosa

(1&6)-Kestotetraosa

β -D-Fructofuranosil-(2 \rightarrow 1)-o-[β -D-Fructofuranosil-(2 \rightarrow 6)]- β -D-Fructofuranosil- α -D-Glucopiranosido.



La investigación sobre métodos de producción de oligosacáridos para alimentación comenzó en Japón en los años 1970-1975. Desde entonces el desarrollo de nuevos compuestos con propiedades funcionales ha continuado y el nicho de mercado también sigue expandiéndose gradualmente (Nakakuki 2005). En el año 1990 se produjeron 4.000 toneladas de FOS (Yun 1996) mientras que en el 1995 fueron 12.000 (Crittenden y Playne 1996). No se

conoce con exactitud la producción actual de FOS pero las cifras más recientes indican que sólo en Japón se generaron 3.500 toneladas de FOS y 6.500 de GOS (Nakakuki 2005). A pesar de que la producción de FOS es inferior a la de GOS, en Europa los FOS son el prebiótico más empleado, debido en parte a que han sido los compuestos bifidogénicos mejor estudiados y caracterizados.

En cuanto a ingestas diarias recomendadas de FOS, en la bibliografía aparecen cifras diferentes, abarcando desde 1 hasta 8 g/día (Bornet 1994, Roberfroid et al. 1998, Santos y Maugeri 2007, Tokunaga et al. 1993). Gracias a sus propiedades prebióticas, los FOS se añaden en la actualidad a un gran número de alimentos, como pueden ser productos de panadería y pastelería, galletas, sopas, cereales, patés, bebidas, leches fermentadas, productos lácteos, fórmulas infantiles, postres, salsas, barritas energéticas o aderezos para ensaladas (Figura 3) (Manning y Gibson 2004).



Figura 3. Varios productos comerciales que contienen FOS.

3 PROPIEDADES NUTRICIONALES DE LA INULINA Y LOS FOS

Datos experimentales obtenidos *in vitro* e *in vivo* tanto en modelos animales como en humanos sostienen la influencia positiva de los FOS de la dieta sobre procesos fisiológicos en diferentes tipos de células intestinales (producción de mucinas, proliferación celular del epitelio colónico, estimulación del sistema inmune, transporte de iones) y también en zonas fuera del tracto gastrointestinal (producción de hormonas, metabolismo de lípidos y carbohidratos) (Delzenne 2003).

3.1 Propiedades beneficiosas en el intestino grueso

La flora intestinal del ser humano es una mezcla compleja de multitud de microorganismos, principalmente bacterias pero también arqueas (0.8%), y virus y levaduras (0.1-6.3%), que se establece después del nacimiento y que se va modificando con la edad y la alimentación (Arumugam et al. 2011, Vacharaksa y Finlay 2010). Aunque la mayoría de grupos bacterianos pueden encontrarse en todos los individuos, hay diferencias notables a nivel de especies entre diferentes personas. Es decir, cada ser humano tiene su propia y única flora intestinal (Ramos-Alvarez y Sabin 1956, Blaut 2002, Vacharaksa y Finlay 2010). Recientemente se ha descubierto que hay tres tipos de poblaciones microbianas intestinales en los seres humanos, (*Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus*), denominadas así según el género bacteriano dominante. Este hallazgo podría ser determinante para determinar las causas de la obesidad y de la enfermedad inflamatoria intestinal, así como en el desarrollo de la medicina personalizada (Arumugam et al. 2011).

En el tracto gastrointestinal (TGI) del ser humano se estima que hay aproximadamente 100 trillones ($100 \cdot 10^{12}$) células bacterianas que pertenecen a más de 1000 especies diferentes (predominantemente de los *phyla* Firmicutes y Bacteroidetes) (Figura 4) (Steinhoff 2005, Vacharaksa y Finlay 2010, Arumugam et al. 2011). Según esta estimación, hay 10 veces más bacterias en el TGI que células somáticas en el cuerpo (Rodríguez-Gómez, 2009). Se considera que solo 50-60 especies serían dominantes y constituirían el 90% de la población total. La modulación de esta población a partir de la administración de sustancias prebióticas con el fin de promover un equilibrio que incida en la salud y el bienestar del ser humano está

suscitando en la actualidad un gran interés (Blaut 2002, Sabater-Molina et al. 2009).

Para mantener o incluso mejorar la salud y el bienestar y reducir el riesgo de padecer enfermedades, es altamente recomendable mantener una flora intestinal equilibrada (Roberfroid 2007a). Esto viene determinado por un balance positivo entre bacterias reconocidas como beneficiosas y bacterias patógenas o dañinas. Los efectos beneficiosos de la flora intestinal incluyen aspectos tan distintos como la producción de vitaminas (B12, K, biotina, ácido fólico y pantoténico), la modulación del sistema inmune o la transformación de ácidos biliares. Las bacterias patógenas son capaces de formar tóxicos, mutágenos o carcinógenos (Blaut 2002). Sin embargo, todas las bacterias de la flora intestinal son necesarias, ya que cada una juega un papel específico y particular que beneficia a toda la comunidad. La clave está en que debe haber un número predominante de aquellas beneficiosas para controlar la proliferación de las potencialmente patógenas (Gibson y Roberfroid 1995).

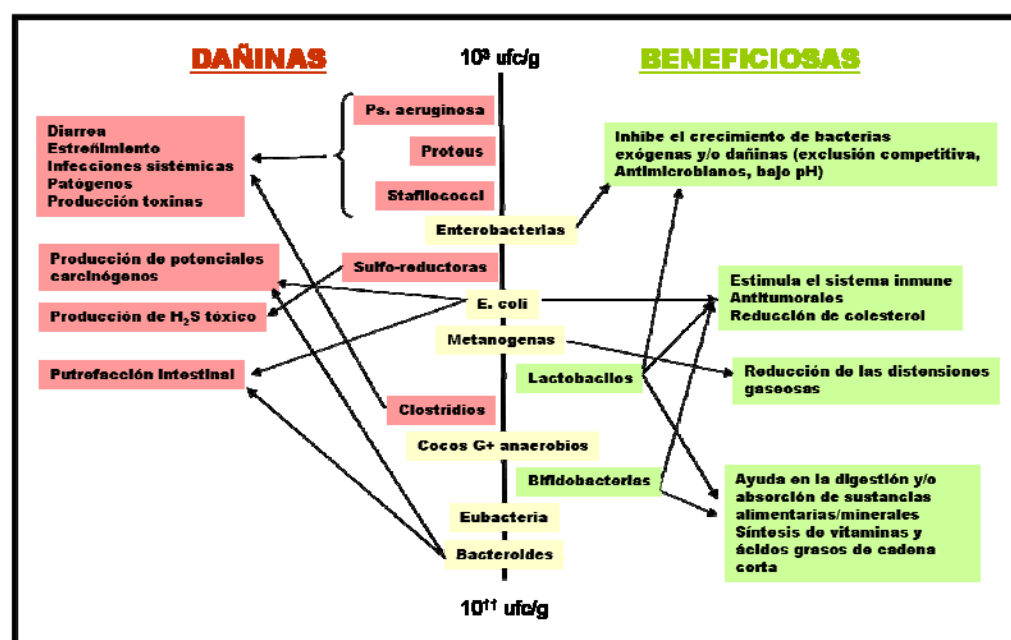


Figura 4. Microbiota intestinal humana y posibles efectos para la salud. Adaptado de Requena Rolanía et al. 2009.

El número y la diversidad de especies de microorganismos presentes a lo largo de todo el TGI varía considerablemente debido a las diferentes condiciones ambientales que hay en las distintas secciones del mismo. El estómago y duodeno de sujetos sanos tienen muy poca densidad celular bacteriana, alrededor de 10^1 - 10^3 células/ml, a causa de los bajos pH (2-4) que hay en esas zonas debido a la secreción de HCl en el estómago. En partes más distales del intestino delgado la densidad bacteriana aumenta a 10^4 - 10^8 cel/ml, llegando a superar las 10^{12} células/g en el colon, donde al parecer se encuentran las condiciones más favorables para la fermentación bacteriana (Blaut 2002). Más del 99% de las bacterias encontradas en heces de adultos sanos son anaerobias estrictas, lo que determina que el metabolismo bacteriano en el colon es mayoritariamente anaeróbico (Moore y Holdeman 1974, Vacharaksa y Finlay 2010).

Los sustratos que utilizan los microorganismos de la flora intestinal para obtener energía son diversos, incluyendo proteínas no digeridas durante el tránsito por el TGI, enzimas pancreáticas, mucus, bacterias lisadas, células epiteliales mudadas, etc. Los principales sustratos, sin embargo, son los carbohidratos no digeribles de origen vegetal como el almidón resistente, celulosa, hemicelulosa, pectina, inulina, etc., denominados en su conjunto fibra dietética (Blaut 2002).

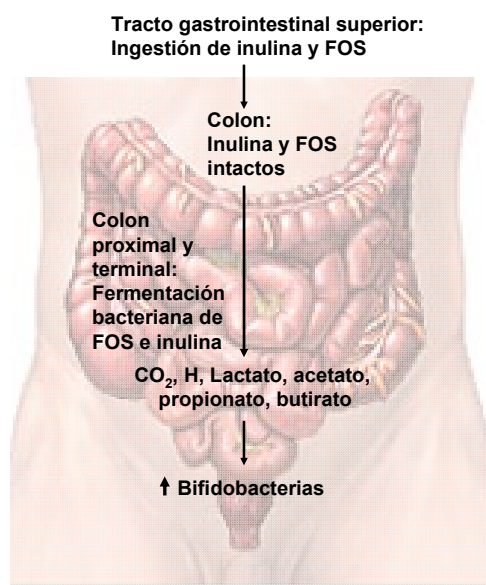


Figura 5. Destino metabólico de los prebióticos tipo inulina (Kelly 2008).

Las bacterias sintetizan diferentes metabolitos, dentro de los cuales se encuentran los ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato), gases (H_2 y CO_2) y en menor medida, formato, valerato y caproato (Figura 5). En el colon, la concentración total de ácidos grasos de cadena corta está entre 70-100 mM (Cummings et al. 1987). El patrón de ácidos grasos de cadena corta sintetizados y el efecto prebiótico que se produce como consecuencia de la ingesta de FOS, son procesos dinámicos que varían según la naturaleza química y el grado de polimerización de los FOS, la duración del tratamiento, la composición de la flora intestinal inicial o la dieta en la cual son administrados (Delzenne 2003). Los ácidos grasos de cadena corta son utilizados como fuente de energía bien por células del epitelio colónico (butirato), bien por células de otros tejidos tras ser absorbidos y transportados. El butirato podría jugar un papel importante en la proliferación y diferenciación celular (Litvak et al. 1998, Mortensen y Clausen 1996).

Promoción del crecimiento de bacterias beneficiosas en la flora intestinal

La administración de FOS en la dieta promueve el crecimiento y/o actividad de bifidobacterias y lactobacilos en el colon. La ingesta de 8 g diarios de FOS durante dos semanas hace aumentar hasta en 10 veces la población de bifidobacterias en el intestino (Mitsuoka et al. 1987). Esto se ha relacionado con mejoras en la salud ya que estas bacterias, además de producir vitaminas y enzimas digestivos, también producen compuestos que inhiben el crecimiento de bacterias y levaduras perjudiciales como algunas especies de *E. coli*, clostridia, veilloneae o *Candida*. Asimismo niveles superiores de estas bacterias beneficiosas en el colon provocan una reducción de los niveles de amonio sanguíneos (Chow 2002, Gibson y Roberfroid 1995).

Estudios in vitro han demostrado que diferentes tipos de bifidobacterias son capaces de metabolizar FOS tipo levano (enlace β 2→6) como la 6-kestosa o FOS tipo inulina (enlace β 2→1) como la 1-kestosa. La eficiencia en la metabolización de estos compuestos es dependiente de la especie (Marx et al. 2000). Se ha observado que los polímeros de elevado peso molecular, tanto levano (DP>37) como inulina (DP>28), no son sustratos adecuados para el crecimiento de las bifidobacterias, lo que sugiere

que un factor decisivo para la asimilación de estos compuestos es su grado de polimerización (Marx et al. 2000).

Regularización de hábitos intestinales

Como fibra dietética, los FOS y la inulina incrementan la biomasa fecal y el contenido en agua de las heces, de modo que se estimula el peristaltismo intestinal y se consigue una mejora en los hábitos intestinales (Roberfroid 2005). Asimismo se ha visto que la administración de FOS incrementa la excreción de nitrógeno en heces (Chow 2002). Los FOS de cadena corta se asocian a una reducción del pH fecal, un incremento de ácidos orgánicos en el colon, un descenso en la producción de subproductos finales del nitrógeno en orina y heces, un descenso en la actividad enzimática bacteriana fecal (β -glucuronidasa, ácido glicólico hidroxilasa, nitroreductasa y azoreductasa) y una modificación de los esteroides neutros en heces, en particular el colesterol (Bornet et al. 2002).

Biodisponibilidad de minerales

Otro de los beneficios que presenta la administración de prebióticos tipo FOS en la dieta es la mejora de la absorción de minerales tan importantes como el Ca y el Mg. El intestino delgado es la zona donde normalmente estos minerales se absorben pero gracias a los ácidos grasos de cadena corta generados como productos de la flora intestinal tras la ingesta de prebióticos, el colon también es capaz de absorberlos de manera eficiente. Además, estas sustancias prebióticas son capaces de mejorar la biodisponibilidad de isoflavonas de soja, potentes sustancias antiinflamatorias y anticancerígenas. Es más, si se combina la ingesta dietética de FOS e isoflavonas se observa un incremento de la densidad mineral ósea en ratones (Bornet et al. 2002, Tokunaga 2004).

Mecanismo de defensa frente a infecciones

Los mecanismos de defensa del cuerpo humano son múltiples e involucran a diferentes órganos, incluyendo al tracto gastrointestinal (Roberfroid 2007a). Se considera que la flora intestinal es el mayor determinante en el desarrollo del sistema inmunitario (Berg 1996). Una alimentación deficiente puede reducir o inhibir las funciones de defensa frente a agentes externos.

Hay datos que apoyan la hipótesis de que los fructanos tipo inulina son uno de los ingredientes funcionales que pueden mejorar los mecanismos de defensa del organismo modulando la morfología y espesor del epitelio intestinal, así como mejorando la composición de las mucinas. Todas estas modificaciones a nivel del TGI consiguen aumentar la resistencia a la colonización y prevenir la translocación bacteriana (Roberfroid 2007a).

Los fructanos tipo inulina también afectan al sistema inmune de forma beneficiosa, especialmente a nivel intestinal, dirigiendo su función hacia el tejido linfóide asociado al TGI, especialmente a las placas de Peyer, de forma que, indirectamente, reducen el riesgo de padecer enfermedades relacionadas con disfunciones de los mecanismos de defensa gastrointestinales (Guarner 2005, Watzl et al. 2005).

Actividad enteroendocrina

Las células enteroendocrinas son un grupo complejo de células epiteliales intestinales que sintetizan hormonas que juegan un papel importante en la regulación gastrointestinal (Wang et al. 2004). Datos experimentales en los últimos años han demostrado que el TGI humano produce una serie de péptidos enteroendocrinos que controlan y modulan diferentes procesos metabólicos y fisiológicos (Burcelin 2005, Wynne et al. 2005). Dos de esos péptidos son el GLP-1 (glucagon-like peptide-1) y la grelina, que influyen en la regulación del apetito. El GLP-1 inhibe el apetito (anorexigénico), mientras que la grelina lo estimula (orexigénico) (Date et al. 2000, Drucker 2002, Sakata et al. 2002). Se han realizado ensayos que demuestran el papel de los fructanos tipo inulina en la modulación de la producción de estos péptidos, con la consiguiente repercusión en la regulación del apetito (Delzenne et al. 2005).

3.2 Regularización del metabolismo lipídico

La combinación de elevados niveles de triglicéridos (TG) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) junto con bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), representa el factor de riesgo modificable más importante en las enfermedades cardiovasculares. Concretamente el control de los niveles de TG es el parámetro que más está emergiendo para la prevención de estas enfermedades (Ballantyne et al. 2001).

La mayoría de estudios acerca de sustancias prebióticas se han realizado utilizando inulina y oligofructosa, dando resultados convincentes sobre la reducción de los niveles de lípidos sanguíneos en animales, aunque son necesarias altas dosis de estos compuestos para producir los efectos deseados. Probablemente la reducción de los niveles de TG en sangre se debe principalmente a una inhibición de la lipogénesis en el hígado y también a una reducción de la re-esterificación hepática de ácidos grasos, reduciendo la secreción de TG. Esta represión en la lipogénesis puede deberse a una reducción de los niveles de insulina/glucosa o también a una exposición selectiva del hígado a cantidades elevadas de ácido propiónico producido en el intestino grueso en la fermentación de los carbohidratos no digeribles. La disminución del colesterol en plasma se podría deber también a la inhibición de la síntesis de colesterol por el ácido propiónico o por modificaciones en el metabolismo de los ácidos biliares. Estudios en ratones muestran que la inulina y los FOS pueden inhibir la acumulación de TG en el hígado y tienen efectos favorables sobre la esteatosis hepática (retención anormal de lípidos en células hepáticas) (Beylot 2005, Delzenne et al. 2002). Se observó que en personas con una lipemia normal el efecto de los FOS es más marcado sobre los niveles de TG que sobre los de colesterol, y que la inulina es más activa que la oligofructosa (Beylot 2005). Por otro lado, se ha comprobado que la administración de prebióticos a personas con hiperlipemia, reduce sus niveles de colesterol en sangre, mientras que, el efecto dominante es sobre los niveles de triglicéridos séricos (Beylot 2005, Pereira y Gibson 2002). En un meta-análisis a partir de artículos publicados acerca de la relación entre la ingesta de FOS tipo inulina sobre los niveles de TG en sangre en humanos, se determinó que realmente ejercían un efecto positivo ya que reducían significativamente los TG séricos (Brighenti 2007).

3.3 Reducción del riesgo de padecer enfermedades

Enfermedad inflamatoria intestinal

Aunque la patogénesis exacta de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es poco conocida, hay cada vez más evidencias de que la microflora intestinal juega un papel determinante. De hecho, pacientes con EII presentan elevados niveles de anticuerpos frente a bacterias intestinales (Macpherson et al. 1996). La administración de prebióticos es una forma de modular la flora intestinal, lo que sugiere su posible uso en la prevención y tratamiento de la EII. Hay estudios que muestran que la administración de

inulina y de FOS en la dieta mejora la colitis inducida en ratas y disminuye la actividad de la enfermedad de Crohn en humanos (Cherbut et al. 2003, Lindsay et al. 2006, Videla et al. 2001). A pesar de ser fermentados en las partes altas del colon, estos oligosacáridos extienden su efecto prebiótico a las partes distales de todo el intestino grueso, promoviendo un efecto positivo en situaciones de inflamación (Lara-Villoslada et al. 2006).

Celiaquía

Estudios recientes han demostrado un efecto beneficioso de las bifidobacterias en pacientes con celiaquía, ya que estas bacterias cambian el patrón de péptidos derivados de la gliadina, atenuando su efecto proinflamatorio en células epiteliales intestinales Caco-2 (Laparra y Sanz 2010).

Cáncer de colon

Diversos estudios en animales han demostrado que los fructanos tipo inulina reducen el riesgo de carcinogénesis en el colon (Roberfroid 2005). La administración de FOS de cadena corta a modelos animales redujo el desarrollo de cáncer de colon incrementando las concentraciones de butirato en el colon y mejorando el sistema inmune efector (Bornet et al. 2002).

3.4 Fórmulas infantiles

Los oligosacáridos de la leche materna juegan un papel fundamental como fibra soluble prebiótica regulando la flora intestinal de los niños recién nacidos. Las fórmulas infantiles suelen carecer de dichos oligosacáridos por lo que en niños alimentados a base de ellas, la composición de la flora intestinal es diferente a la de aquellos alimentados con lactancia materna. Administrar una combinación de prebióticos, como galacto-oligosacáridos de cadena corta y fructooligosacáridos de cadena larga a las fórmulas infantiles, produce un efecto muy beneficioso ya que promueve específicamente el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos, reduciendo a su vez el crecimiento de patógenos hasta niveles similares a los de niños alimentados con lactancia materna. (Fanaro et al. 2005). Este cambio en la flora intestinal produce una bajada del pH de las heces y un patrón de ácidos grasos de cadena corta muy semejante a los niños alimentados con lactancia materna. Experimentos *in vitro* han demostrado que este patrón específico de ácidos grasos de cadena corta, a un pH similar al de las heces de niños con

lactancia materna, reduce el crecimiento de patógenos de forma dependiente a la dosis, mientras que el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos no se ve afectado. En modelos animales la administración de prebióticos mejora la respuesta a las vacunas y disminuye las reacciones alérgicas. Estos resultados son corroborados por los ensayos clínicos que indican una reducción tanto de la respuesta alérgica como de los episodios de infecciones de las vías respiratorias durante los primeros años de vida (Boehm et al. 2005, Fanaro et al. 2005). Además, la administración oral de kestosa a niños con dermatitis atópica parece conseguir atenuar los síntomas clínicos cuando se ingieren 1-2 g/día durante 6-12 semanas (Shibata et al. 2009).

4 OTRAS PROPIEDADES Y APLICACIONES DE LOS FOS

Además de por sus propiedades nutricionales, los FOS se utilizan también en la industria alimentaria ya que presentan propiedades organolépticas y tecnológicas que los hacen adecuados como coadyuvantes en la producción de determinados alimentos procesados (Crittenden y Playne 1996, Sangeetha et al. 2005, Yun 1996). La industria farmacéutica los comercializa directamente como fármacos o suplementos alimenticios por sus propiedades nutricionales (Tabla 4). Se utilizan además en la industria cosmética y también como sustancias prebióticas para alimentación animal en la industria ganadera para prevenir posibles infecciones y trastornos intestinales (Crittenden y Playne 1996).

Tabla 4. Otras aplicaciones de los FOS en la industria alimentaria y farmacéutica.

Industria alimentaria	
Aplicación	Productos
Sustitutivos de grasas	Helados
Reducción del contenido calórico	Jamón light, mermeladas, helados.
Retención de agua	Pasteles, pan, jamón cocido, gelatinas, embutidos
Evitar la formación de cristales	Helados
Emulsionantes	Margarinas
Modificar la textura-cremosidad	Jamón light
Edulcorantes	Pasteles

Industria farmacéutica

Producto	Indicaciones
BIFIBRAN	Suplemento nutricional rico en fibra
ENTERUM	Modificador de la flora intestinal
ELIMINEX	Laxante natural
Smart fructooligosaccharides	Mejorar el tránsito intestinal y reforzar las defensas naturales del organismo

Por todas estas razones, la búsqueda de nuevas o mejoradas vías de producción de FOS es uno de los puntos calientes en el desarrollo biotecnológico de la industria alimentaria.

5 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE FOS

Existen dos vías principales para la producción de FOS:

5.1 Hidrólisis de inulina

El material vegetal que se utiliza en la mayoría de los casos para la producción de oligofructosa, inulina e inulina HP es la raíz de la achicoria, ya que contiene grandes cantidades de fructanos tipo inulina (Tabla 2). La inulina se extrae con agua hirviendo obteniéndose mayoritariamente fructanos GF_n y F_n con un grado de polimerización que oscila entre 2 y 60 (DP medio de 10-12). Un 10% de lo que se extrae de las raíces de la achicoria son cadenas de fructano con un grado de polimerización que oscila entre 2 (F₂) y 5 (GF₄). El resto son azúcares libres como glucosa, fructosa o sacarosa presentes en la raíz (Coussement 1999, Roberfroid 2007a). A partir de este extracto, con la ayuda de métodos mecánicos se pueden separar compuestos en función de su grado de polimerización (Roberfroid 2007a). La oligofructosa puede también obtenerse por hidrólisis parcial del polisacárido inulina, llevada a cabo por endo-inulinasas (Coussement 1999, Roberfroid 2007a).

5.2 Síntesis enzimática

Los FOS pueden producirse también mediante síntesis enzimática a partir de sacarosa. La sacarosa (α -D-Glc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fru) se obtiene a partir de fuentes vegetales, principalmente de cultivos de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) y de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*). También presentan cantidades apreciables de sacarosa la palmera datilera (*Phoenix dactylifera*), el sorgo (*Sorghum vulgare*) y el arce sacarino (*Acer saccharum*) (Anglani 1998, Perkins y van den Berg 2009, Samarawira 1983, Waclawovsky et al. 2010). La caña de azúcar es una importante fuente alimentaria y bioenergética. Se estima que el cultivo de esta planta abarca aproximadamente el 0.5% del área usada para la agricultura a nivel mundial (FAOSTAT 2008). Además es el cultivo que mayor tonelaje produce, incluso por encima de los cereales más importantes como el trigo, el maíz y el arroz que ocupan una superficie de tierra cultivable a nivel mundial varias veces mayor. Se estima que en el año 2008/2009 se produjeron 558 millones de toneladas de caña de azúcar, de las cuales la mitad serán destinadas a la producción de etanol (Waclawovsky et al. 2010). Si hablamos a nivel nacional, en el año 2008 hubo una producción de 500 toneladas de caña de azúcar y 3987500 toneladas de remolacha azucarera, con un precio al productor de 36.30 y 37.10 euros por tonelada respectivamente (FAOSTAT 2008).

La síntesis enzimática de FOS a partir de sacarosa se lleva a cabo por las denominadas fructosil-trasferasas. A partir de una molécula de sacarosa, estas enzimas son capaces de unir moléculas de fructosa con enlaces β (2 \rightarrow 1), β (2 \rightarrow 6) o ambos, según la especificidad de la enzima en concreto (Coussement 1999, Ninness 1999).

Frecuentemente, las glico-hidrolasas son capaces de catalizar tanto la hidrólisis de un enlace glicosídico como su formación, y su actividad en uno u otro sentido depende en gran medida de la conformación del centro activo y de las condiciones ambientales en las que actúen (Painbeni et al. 1992, Sanz-Aparicio et al. 1998). Esta dualidad permite el uso de enzimas hidrolíticas en reacciones biosintéticas (Faijes et al. 2003, Takegawa y Fan 2003). En la actualidad, las preparaciones comerciales de FOS se producen utilizando hidrolasas fúngicas para generar oligosacáridos de cadena corta (3-5 unidades). Estas enzimas pertenecen a la familia GH32, según la clasificación de glico-hidrolasas (Carbohydrate-Active Enzymes server: URL:

<http://www.cazy.org>) (Coutinho y Henrissat 1999, Henrissat 1991, Henrissat y Davies 1997, Cantarel et al. 2009). Existen además otras enzimas de esta misma familia cuyas propiedades las convierten en excelentes candidatas para ser utilizadas en la producción de prebióticos.

6 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ENZIMAS UTILIZABLES PARA LA PRODUCCIÓN DE FOS

Estudios recientes han mostrado que hay un gran número de especies de levaduras, tanto ascomicetos como basidiomicetos, que en la actualidad todavía no se han descubierto. Algunas estimaciones indican que sólo se han descrito el 1% de todas las especies de microorganismos que existen en la naturaleza (Boekhout 2005). A día de hoy se conocen diversas bacterias, hongos, y plantas que poseen enzimas capaces de sintetizar FOS (Tabla 5). Estas enzimas son fructosiltransferasas (FTasa, EC 2.4.1.-) o β -D-fructofuranosidasas (FFasa, EC 3.2.1.26) con alta actividad transfructosilante como reacción lateral. Las enzimas usadas industrialmente para la producción de FOS proceden de *A. niger* (Hidaka et al. 1988) y de *Aureobasidium pullulans* (Yun 1996), aunque se han publicado artículos acerca de la producción de FOS utilizando β -D-fructofuranosidasas de otros microorganismos como *Aspergillus oryzae* (Kurakake et al. 1996), *Aspergillus japonicus* (Chien et al. 2001) y *Schwanniomyces occidentalis* (Alvaro-Benito et al. 2007). Las fructosiltransferasas son producidas intra y extracelularmente por diversos hongos y plantas (Maiorano et al. 2008, Sangeetha et al. 2005). Se han encontrado cepas bacterianas que producen inulinasas pero muy pocas sintetizan fructosil-transferasas (Sangeetha et al. 2005).

La búsqueda de nuevos microorganismos en diferentes ambientes ha atraído en las últimas décadas la atención conjunta de biotecnólogos y microbiólogos debido al potencial de encontrar nuevas enzimas de interés para el ser humano (Maiorano et al. 2008). En este sentido, la búsqueda de nuevos catalizadores para la síntesis de FOS no es una excepción. Entre la gran variedad de microorganismos aún no descubiertos se podrían encontrar fructosiltransferasas con mayor eficiencia catalítica, termorresistencia o estabilidad general que las empleadas actualmente. Por otro lado, conforme avancen las investigaciones respecto a la relación entre el patrón de FOS y

su eficiencia prebiótica, se podrán además seleccionar enzimas según el espectro de FOS a que den lugar.

Tabla 5. Fuentes bacterianas, fúngicas y vegetales de enzimas que sintetizan FOS (Maiorano et al. 2008, Sangeetha et al. 2005).

Bacterias	Hongos	Plantas
<i>Arthrobacter</i> sps.	<i>Aspergillus foetidus</i> NRRL337	<i>Agave Americana</i>
<i>Bacillus macerans</i> EG-6	<i>Aspergillus oryzae</i> CRF 202	<i>Agave tequilana</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Aspergillus sydowi</i>	<i>Agave vera cruz</i>
<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Aspergillus japonicum</i> JN19	<i>Allium cepa</i>
	<i>Aspergillus japonicus</i> TIT 90076	<i>Asparagus officinalis</i>
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Cichorium intybus</i>
	<i>Aureobasidium</i> sp.	<i>Crinum longifolium</i>
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Cynara scolymus</i>
	<i>Calviceps purpurea</i>	<i>Festuca arundinacea</i>
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Helianthus tuberosus</i>
	<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
	<i>Penicillium spinulosum</i>	<i>Lactuca sativa</i>
	<i>Penicillium citricum</i>	<i>Lolium perenne</i>
	<i>Penicillium purpurogenum</i>	<i>Lycoris radiata</i>
	<i>Penicillium citrinum</i> KCTC18080P	<i>Taraxacum officinale</i>
	<i>Phytophthora parasitica</i>	
	<i>Rhodotorula</i> sp.	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	
	<i>Sporutrichum thermophile</i>	
	<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	

7 ENZIMAS QUE CATALIZAN LA SÍNTESIS DE FOS.

Según la clasificación del Carbohydrate-Active enZYme Server (<http://www.cazy.org/>) (Coutinho y Henrissat 1999, Henrissat 1991, Cantarel et al. 2009) las enzimas glicosil-hidrolasas (GH), a día de hoy, se distribuyen en 125 familias determinadas por homología de secuencias. Hay familias que se agrupan en clanes si presentan un plegamiento estructural común ya que los plegamientos proteicos están mejor conservados que sus secuencias (Figura 6).

► GH Clans of Related Families

GH-A	(β/α)s	1	2	5	10	17	26	30	35	39	42	50	51	53	59	72	79	86	113
GH-B	β -jelly roll	7	16																
GH-C	β -jelly roll	11	12																
GH-D	(β/α)s	27	31	36															
GH-E	6-fold β -propeller	33	34	83	93														
GH-F	5-fold β -propeller	43	62																
GH-G	(α/α)s	37	63																
GH-H	(β/α)s	13	70	77															
GH-I	$\alpha+\beta$	24	46	80															
GH-J	5-fold β -propeller	32	68																
GH-K	(β/α)s	18	20	85															
GH-L	(α/α)s	15	65	125															
GH-M	(α/α)s	8	48																
GH-N	β -helix	28	49																

Figura 6. Clasificación en clanes de las familias de las GH según su plegamiento estructural.

La síntesis de FOS es producto de la acción combinada de diferentes fructosiltransferasas (1-SST, 1-FFT, 6G-FFT, 6-SFT) (Tabla 6) (Lasseur et al. 2009), mientras que su degradación depende de fructan exohidrolasas. Se considera que las fructan exohidrolasas vegetales evolucionaron a partir de invertasas de pared celular mientras que las fructosiltransferasas procederían de invertasas vacuolares (Van den Ende et al. 2002). Ambos tipos de enzimas pertenecen a las familias GH32 y GH68 (Ritsema y Smeekens 2003). Estas familias, que se agrupan en el clan GH-J, comparten un plegamiento común a pesar incluso de su relativamente baja identidad de secuencia (<15%) (Coutinho y Henrissat 1999, Naumoff 2001, Pons et al. 2000). Las enzimas de este clan tienen un dominio catalítico β -propeller formado por 5 aspas, cada una de las cuales consta de 4 hebras β

antiparalelas con la clásica topología “w” alrededor del eje central (Figura 7). En el bolsillo axial profundo de este dominio se encuentra la cavidad cargada negativamente del centro activo (Lammens et al. 2009).

Tabla 6. Enzimas de la familia GH32 y GH68.

GH32	
Invertasas	EC 3.2.1.26
Inulinasas	EC 3.2.1.7
β -2,6-fructan 6-levanbiohidrolasas	EC 3.2.1.64
Levanasas	EC 3.2.1.65
Exo-inulinasas	EC 3.2.1.80
Fructan β -(2,1)-fructosidasas/1-exohidrolasas	EC 3.2.1.153
Fructan β -(2,6)-fructosidasas/6-exohidrolasas	EC 3.2.1.154
Sucrosa:sucrosa 1-fructosiltransferasas (1-SST)	EC 2.4.1.99
Fructan:fructan 1-fructosiltransferasas (1-FFT)	EC 2.4.1.100
Sucrosa:fructan 6-fructosiltransferasas (6-SFT)	EC 2.4.1.10
Fructan:fructan 6G-fructosiltransferasas (6G-FFT)	EC 2.4.1.243
Levan fructosiltransferasas	EC 2.4.1.-
GH68	
Levansucrasa	EC 2.4.1.10
β -fructofuranosidasa	EC 3.2.1.26
Inulosucrasa	EC 2.4.1.9

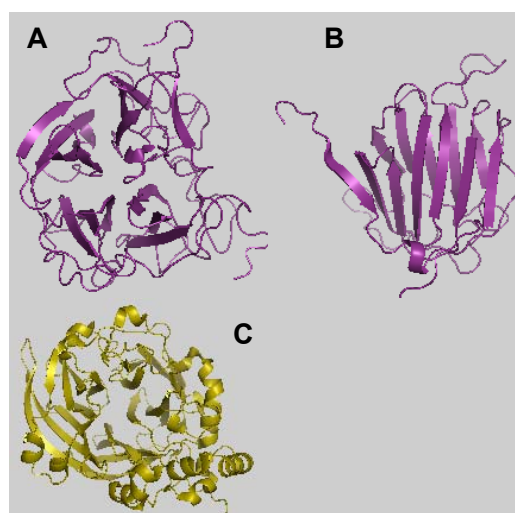


Figura 7. Representación del dominio catalítico β -propeller (A) y β -sándwich (B) de la invertasa (PDB 2AC1) de *A. thaliana* (GH32). C: dominio catalítico de la levansucrasa (PDB 1OYG) de *B. subtilis* (GH68).

7.1 Familia GH32

Las enzimas de la familia GH32 proceden de bacterias, hongos o plantas (Figura 8) y la mayoría contienen, además del dominio β -propeller característico del clan GH-J, un dominio adicional C-terminal (Figura 7) (Lammens et al. 2009). Este dominio tiene un plegamiento tipo β -sándwich, formado por 2 láminas β compuestas por 6 hebras β antiparalelas, y presenta mayor variabilidad de secuencia que el dominio β -propeller (Alvaro-Benito et al. 2010a). Mediante estudios de homología estructural se determinó que presenta similitudes con proteínas tipo lectinas. Las lectinas poseen al menos un dominio no catalítico que se une reversiblemente a un mono o disacárido específico (Lammens et al. 2009). En enzimas glicohidrolíticas de plantas se puede apreciar una clara hendidura entre los dos dominios, que podría jugar un papel importante en el reconocimiento de sustratos tipo fructanos de elevado grado de polimerización (Verhaest et al. 2005, Le Roy et al. 2007). La función del dominio C-terminal no está clara aunque se ha observado que es esencial en la estabilidad global de la proteína (Altenbach et al. 2004). En el caso de invertasas de levaduras, se ha determinado que la mínima unidad funcional es un dímero (Alvaro-Benito et al. 2010a, Reddy et al. 1990). La resolución estructural de la invertasa de *S. occidentalis* ha revelado que el dominio β -sándwich no solo está implicado en la dimerización de la enzima sino que además contribuye a la unión a sustratos de tamaño medio (nistosa) y largo (inulina). Por tanto, al menos en el caso de invertasas de levadura, se asigna tanto al dominio C-terminal β -sándwich como a la oligomerización, una función directa en la reacción catalítica (Alvaro-Benito et al. 2010a).

Hasta la fecha se han resuelto 6 estructuras tridimensionales de la familia GH32 por cristalografía de rayos X y se espera que en fechas próximas estén disponibles las coordenadas cristalográficas de una enzima más (Tabla 7).

Se han determinado tres residuos ácidos conservados, dos aspárticos (D) y un glutámico (E), conocidos como la tríada catalítica que son indispensables para la unión a sustrato y la catálisis. Estos tres residuos se localizan en tres motivos conservados "WMNDPNG", "EC" y "RDP" (Pons et al. 2000, Reddy y Maley 1996, Reddy y Maley 1990).

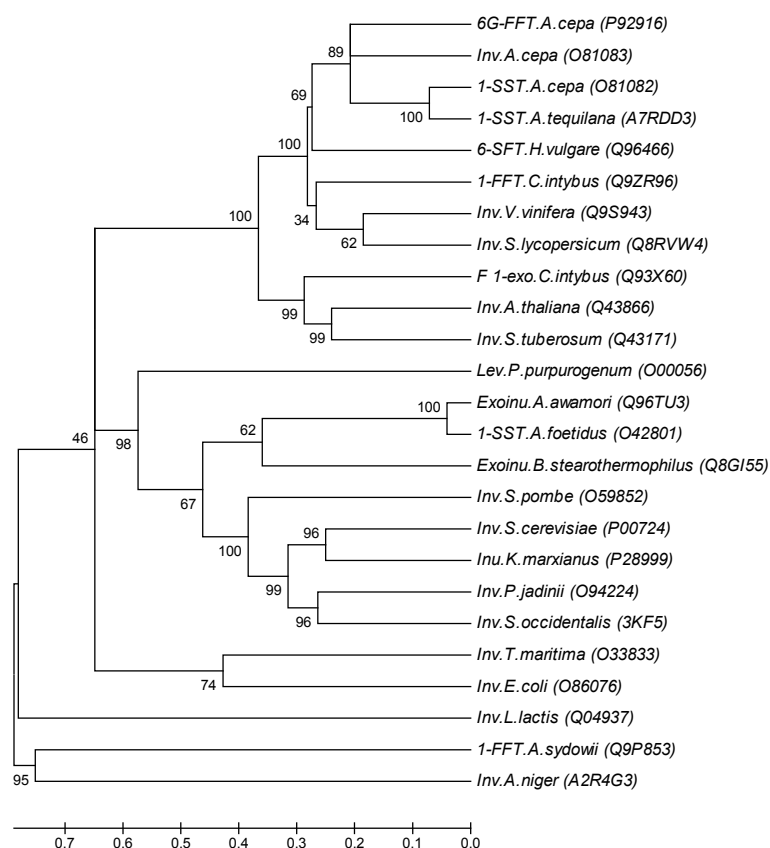


Figura 8. Árbol filogenético de diferentes enzimas de la familia GH32 procedentes de bacterias, hongos o plantas. Inv: invertasa; F 1-exo: Fructan 1-exohidrolasa; Inu: inulinasa; Exoinu: exoinulinasa; Lev: levanasa; 6G-FFT: 6(G)-fructosiltransferasa/2,1-fructan:2,1-fructan 1-fructosiltransferasa bifuncional; 1-SST: Sucrosa:sucrosa 1-fructosiltransferasa; 6-SFT: Sucrosa:fructan 6-fructosiltransferasa 1-FFT: Fructan-fructan 1-fructosiltransferasa. Entre paréntesis se indica el código Uniprot de cada enzima y en los nodos el valor de Bootstrap de 1000 réplicas. La escala muestra la divergencia relativa de secuencia.

El aspártico del motivo “RDP” no parece estar directamente involucrado en el mecanismo catalítico, sino que probablemente esté implicado en la estabilización del estado de transición interaccionando con el residuo fructosilo donador (ver mecanismo catalítico más adelante) (Meng y Futterer 2003). El motivo “WMNDPNG”, denominado motivo β -fructosidasa o caja de unión a sacarosa, está conservado entre invertasas vacuolares y de

pared celular ácidas, pero es diferente en transferasas de la misma familia GH32 (Ritsema et al. 2004, Ritsema et al. 2006, Schroeve et al. 2008). Se ha observado que tres aminoácidos de este motivo (el triptófano y las dos asparagina) son importantes en el desarrollo y la especificidad de la actividad transfructosilante (Ritsema et al. 2004, Ritsema et al. 2006, Schroeve et al. 2008). El motivo “EC” contiene el aminoácido catalítico ácido-base y una cisteína conservada en las familias GH32, que en las enzimas de la familia GH68 es una Arginina (Lammens et al. 2009).

Alrededor del centro activo de las enzimas de la familia GH32 se encuentra además, una zona aromática conservada, denominada “bolsillo hidrofóbico”, que está principalmente constituida por residuos de triptófano o fenilalanina, localizados dentro de cuatro motivos conservados **WMNDPNG**, **WSGSAT**, **WGN** y **WS/GY** y que parece importante para la unión óptima y estable de la sacarosa (Figura 9) (Altenbach et al. 2009, Lammens et al. 2009, Le Roy et al. 2007).

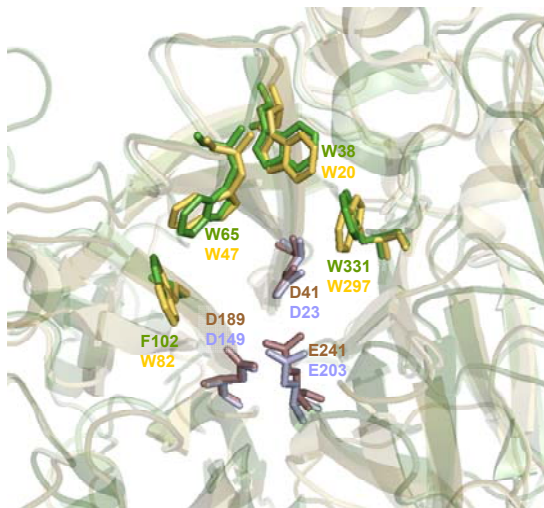


Figura 9. Localización de los residuos que forman el bolsillo hidrofóbico (en verde y amarillo) y la tríada catalítica (en marrón y violeta) de la exo-inulinasa (1Y4W) de *A. awamori* y de la invertasa (2AC1) de *A. thaliana*, respectivamente.

Tabla 7. Estructuras resueltas de enzimas pertenecientes a la familia GH32. DMDP: 2,5-Dideoxy-2,5-imino-D-mannitol.

Proteína	Organismo	GenBank	Uniprot	PDB/3D	Caract/ Complejo con
Exo-inulinasa (InuA) EC 3.2.1.153	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> KP1289	BAC45010.1	Q8GI55	cryst	-
Invertasa EC 3.2.1.26	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	AAD36485.1	O33833.1	1UTW	Wild-type/-
		CAA04518.1		1UYP	Wild-type/-
		NP_229215.1		1W2T	Wild type/Rafinosa
		AAK76450.1		2AC1	Wild-type/-
Invertasa 1 de pared cellular EC 3.2.1.26	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAL85153.1	Q9LIB8	2OXB	E203Q/Sacarosa
		BAB01930.1		2QQU	D239A/Sacarosa
		BAH56786.1		2QQV	E203A/Sacarosa
		CAA52619.1		2QQW	D23A/Sacarosa
		CAA52620.1			
		NP_187995.1			
		NP_566464.1			
Exo-inulinasa (Inu1) EC 3.2.1.80	<i>Aspergillus awamori</i> var. 2250	CAC44220.1	Q96TU3	1Y4W	Wild-type/-
				1Y9G	Wild type/Fructosa
				1Y9M	Wild-type/-
				3LDK	Wild type/Sacarosa
				3LDR	Wild type/1-Kestosa
Fructosiltransferasa EC 2.4.1.100	<i>Aspergillus japonicus</i> CB05			3LEM	Wild type/Nistosa
				3LF7	Wild-type/-
				3LFI	Wild type/Glucosa
				3LIG	D191A/-
				3LIH	Wild type/Rafinosa
Fructan 1-exohidrolasa IIa EC 3.2.1.153	<i>Cichorium intybus</i>	AAP85536.1	Q93X60	1ST8	Wild-type/-
		CAC37922.1		2ADD	Wild type/Sacarosa
				2ADE	Wild type/Fructosa
				2AEY	Wild type/DMDP
Invertasa (Inv) EC 3.2.1.26	<i>Schwanniomyces occidentalis</i>			3KF3[A,B]	Wild type/Fructose
				3KF5[A,B]	Wild-type

7.2 Mecanismo de reacción de enzimas hidrolíticas y transfructosilantes

La formación de un nuevo enlace glicosídico que tiene lugar en una reacción de transfructosilación y la hidrólisis de ese mismo enlace, son reacciones con un mecanismo catalítico muy similar y por tanto son potencialmente catalizables por una misma enzima.

La hidrólisis enzimática de enlaces glicosídicos tiene dos posibles consecuencias estereoquímicas, inversión o retención de la configuración del carbono anomérico (Koshland y Stein 1954). Este mecanismo molecular se mantiene conservado entre enzimas de la misma familia (Davies y Henrissat 1995, Gebler et al. 1992). Las enzimas pertenecientes a las familias GH32 y GH68, que retienen la configuración del carbono anomérico, operan mediante un mecanismo de desplazamiento doble (Reddy y Maley 1996). El primer paso, que es común tanto para hidrolasas como transferasas, consiste en un ataque nucleofílico llevado a cabo sobre el carbono anomérico del grupo fructosilo por el carboxilo del nucleófilo, formando un intermediario covalente enzima-fructosa. El residuo ácido-base actúa como un ácido normal, donando un protón al grupo glucosilo liberando la glucosa (Figura 10).

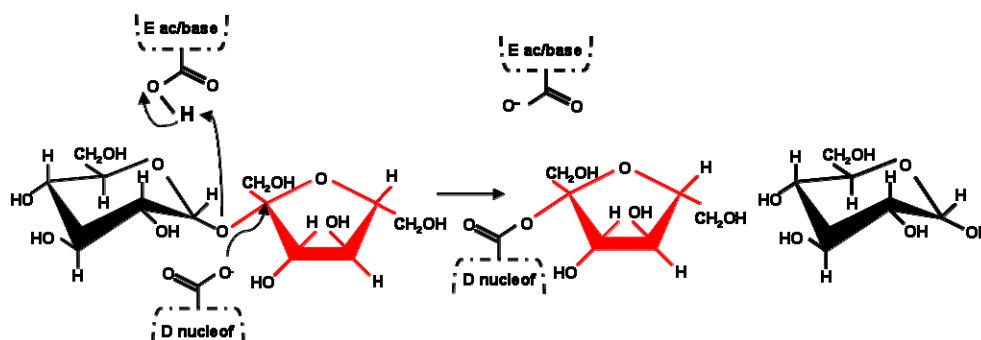


Figura 10. Primera etapa en la reacción enzimática de hidrolasas y fructosil-transferasas.

En el segundo paso el catalizador ácido-base actúa como una base normal eliminando un protón de la molécula aceptora (Koshland y Stein 1954, Lee et al. 2003). En el caso de la reacción de hidrólisis, la molécula aceptora

es el H_2O (Figura 11-A) mientras que en la reacción de transfructosilación la molécula aceptora puede ser otra molécula de sacarosa o un fructooligosacárido (Figura 11-B). En función de la molécula aceptora y del grupo hidroxilo que se desprotona por el residuo ácido-base, se pueden formar diferentes compuestos (Tabla 8 y Figura 12).

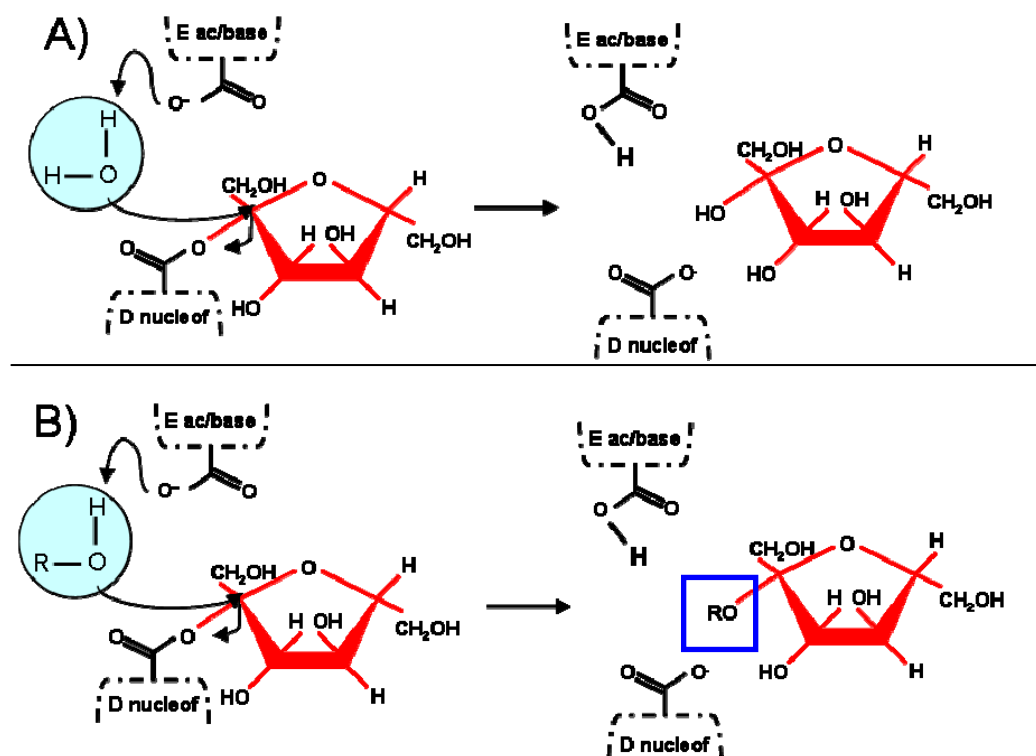


Figura 11. Segunda etapa en la reacción enzimática de hidrolasas (A) y fructosil-transferasas (B).

FOS	Aceptor	Grupo hidroxilo desprotonado
1-Kestosa	Sacarosa	carbono 1 del fructosilo
6-Kestosa	Sacarosa	carbono 6 del fructosilo
Neokestosa	Sacarosa	carbono 6 del glucosilo.
Nistosa	1-Kestosa	carbono 1 del fructosilo terminal
Bifurcosa	1-Kestosa	carbono 6 del fructosilo intermedio

Tabla 8. FOS sintetizados en función de la molécula aceptora del grupo fructosilo y del grupo hidroxilo que se desprotona.

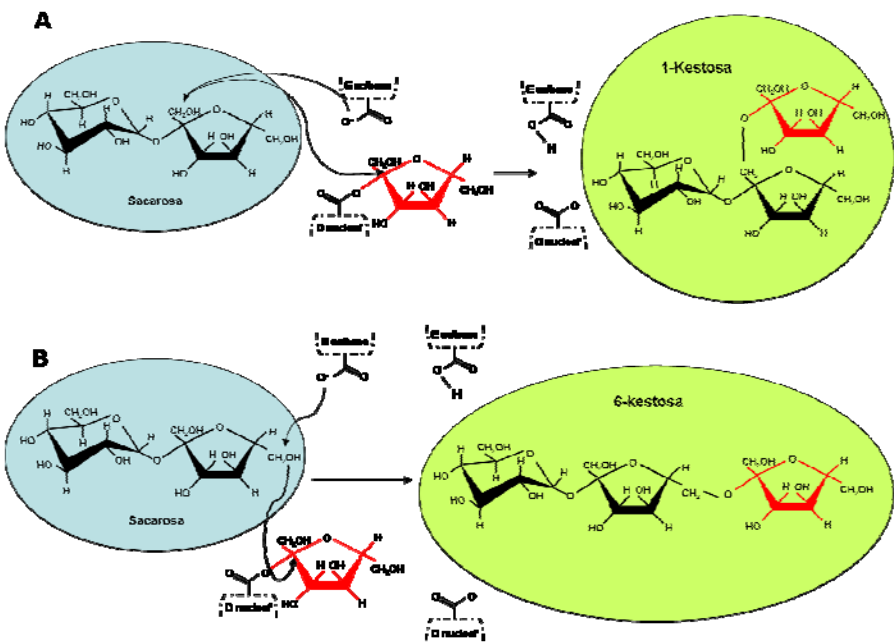


Figura 12. Segunda etapa de la reacción transfructosilante y formación de diferentes FOS en función del sustrato aceptor, sacarosa (A, B, C) o 1-kestosa (D, E). Continúa en la página siguiente.

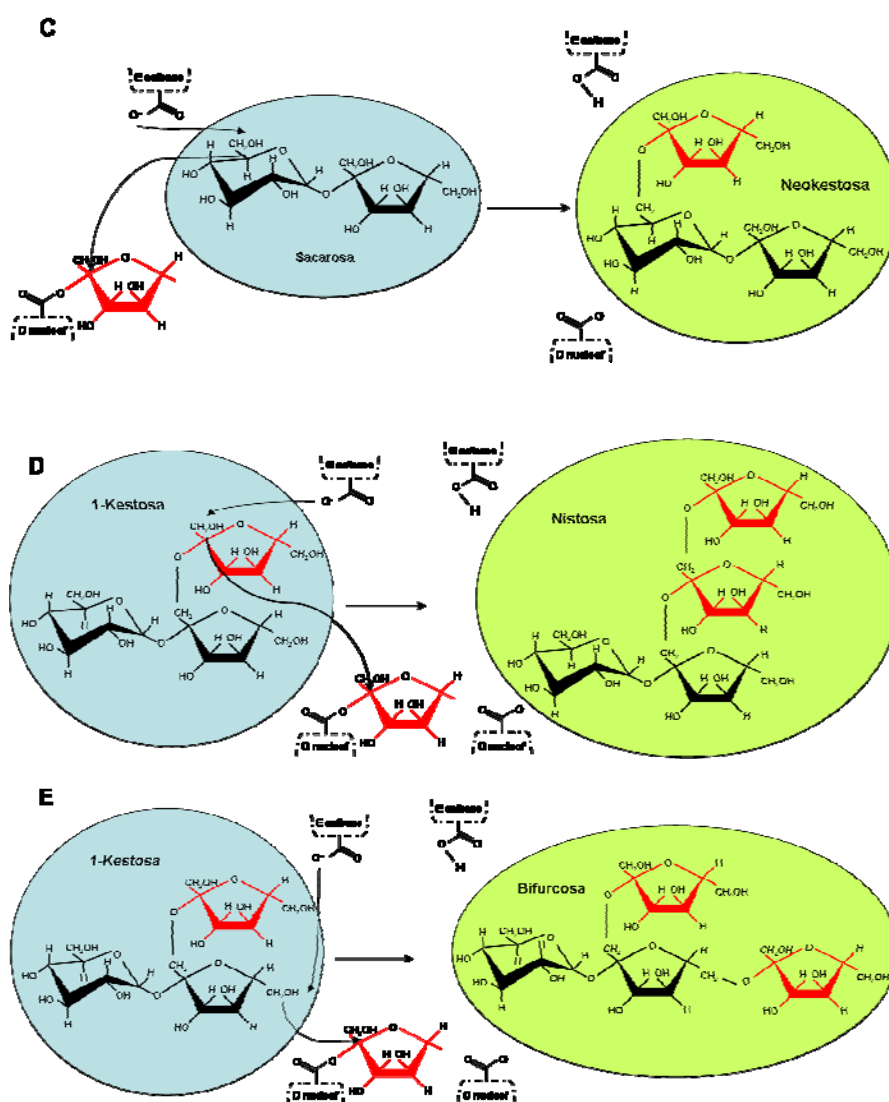


Figura 12. Continuación.

8 INVERTASA (*SUC2*) DE *S. cerevisiae*

La invertasa (β -fructosidasa, sucrasa o β -fructofuranosidasa, EC 3.2.1.26) es una de las primeras enzimas que se caracterizaron. Fue descubierta en 1871 por Ernst Hoppe-Seyler y se la denominó invertasa porque esta enzima a partir de sacarosa (dextrógira) produce azúcar “invertido” (una mezcla 1:1 de D-glucosa dextrógira y D-fructosa levógira). Estas enzimas escinden la sacarosa (α -D-Glc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fru) en glucosa y fructosa rompiendo el enlace glicosídico que los une.

La sacarosa se utiliza como fuente de energía y carbono en muchos seres vivos, como bacterias, hongos y plantas. En plantas, la glucosa y la fructosa están implicadas en las rutas de señalización, por lo que la concentración de sacarosa juega un papel importante como sensor de su estado nutricional, y por lo tanto, la invertasa tiene una función determinante en controlar el desarrollo y diferenciación celular (Sturm 1999, Sturm y Tang 1999).

Aunque los animales, incluyendo al hombre, muestran una gran preferencia por dietas que contienen sacarosa, sus genomas no codifican invertasas. En su lugar, para hidrolizar sacarosa utilizan α -glicosidasas (EC 3.2.1.48), otro tipo de enzimas que no están relacionadas filogenéticamente con las invertasas (Alberto et al. 2004). Los genomas de microorganismos intestinales humanos como especies del género *Bifidobacterium* (Schell et al. 2002) sí codifican invertasas, de modo que se pueden aprovechar de la gran ingesta de sacarosa por parte del ser humano (Alberto et al. 2004).

Existen invertasas dentro de las familias GH32, GH68 y GH100 y algunas de ellas han demostrado tener una importante capacidad transfructosilante.

En *Saccharomyces cerevisiae* la invertasa es codificada por una familia de genes formada por *SUC1*, *SUC2*, *SUC3*, *SUC4*, *SUC5* y *SUC7*. Una cepa de levadura específica puede presentar uno, varios o ninguno de estos genes de forma funcional, si bien, todas las cepas de levadura de *S. cerevisiae* llevan en su genoma al menos uno de los dos alelos naturales conocidos (*SUC2*⁺ o el alelo silencioso *suc2*⁰) en el locus *SUC2* (Carlson et al. 1985, Carlson y Botstein 1983). Los niveles de producción de invertasa son muy variables, y dependen de la cepa y del gen *SUC* presente en la célula. La diferencia de expresión de las diferentes invertasas depende de la eficiencia en la transcripción de los distintos promotores de los genes *SUC*

(del Castillo L. et al. 1992). Cada uno de estos genes codifica una forma extracelular y una forma intracelular de invertasa (Gozalbo y del Castillo Agudo 1994).

La invertasa que es codificada por el gen *SUC2* es expresada mayoritariamente de forma extracelular aunque también hay una forma intracelular producida en menor cantidad (Gascon et al. 1968). Ambas enzimas provienen del mismo gen *SUC2* pero son traducidas desde codones de inicio diferentes (Perlman et al. 1982, Perlman y Halvorson 1981). La forma intracelular permanece en el citosol mientras que la extracelular, gracias a la presencia del péptido señal, es capaz de entrar al retículo endoplásmico. Además, esta enzima se glicosila durante el proceso de secreción y transporte al espacio periplásmico, aumentando un 50% (w/w) su masa molecular debido a la incorporación de, como media, 10 oligosacáridos de manosa. Una vez procesada, la invertasa extracelular es idéntica a la intracelular salvo por la presencia de dos aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal de la primera (Carlson et al. 1983) (Figura 13).

La mínima unidad funcional es un dímero, que es la forma en que se encuentra la invertasa intracelular. La forma extracelular puede auto-asociarse formando además de dímeros, tetrámeros, hexámeros u octámeros observándose en todos ellos la misma actividad específica. Se ha propuesto que esta oligomerización está mediada por los oligosacáridos de manosa (Chu et al. 1983, Reddy et al. 1990, Williams et al. 1985). Se ha podido constatar que la estructura cuaternaria mayoritaria de la invertasa extracelular a pH 5 es un octámero (Chu et al. 1983) que se forma a partir de subunidades glicosiladas en el lumen del retículo endoplásmico. Se ha observado que la retención de la invertasa en el espacio periplásmico está determinada por el alto grado de glicosilación y por la formación de la especie octamérica.

La forma intracelular no glicosilada se expresa constitutivamente, mientras que la invertasa secretada glicosilada está sujeta a represión catabólica (Dodik y Rothstein 1964). La forma dimérica de la invertasa citoplasmática es menos estable que su homóloga periplásmica (Chu et al. 1983, Gascon y Lampen 1968).

La invertasa de *S. cerevisiae*, como hemos comentado anteriormente, pertenece a la familia GH32. En su secuencia se encuentra la tríada catalítica, dos aspárticos y un glutámico, característicos de esta familia, que

son el Asp22, el Asp151 y el Glu203 (Figura 13) (Reddy y Maley 1996, Reddy y Maley 1990).

El hecho de que la invertasa de *S. cerevisiae* presente una forma intracelular hace muy plausible su expresión y su manipulación genética en *E. coli*. Además, presenta un elevado grado de identidad (47%) con la secuencia de la invertasa de *S. occidentalis*, de la que se ha demostrado una eficiente actividad transfructosilante (Alvaro-Benito et al. 2007). Por tanto, esta enzima puede ser una buena diana biotecnológica para la mejora de la síntesis de FOS.

MLLQAFLLAGFAAKISASMTNETSDRPLVHFTPNKGWMNDPNGLWYDEKDAKWHLYFQYNPNDTVWG
 TPLFWGHATSDDL TNWEDQPIAIPKRND SGAFSGSMVVDYNN TSGFFNDTIDPRQRCVAIWYNTPESE
 EQYISYSLDGGYTFTEYQKNPVLAANSTQFRDPKVFWYEPSQKWIMTAAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLES
 AFANEGFLGYQYECPLIEVPTEQDPSKSYWVMFISINPGAPAGGSFNQYFVG SFNGTHFEAFDNQSRVV
 DFGKDYYALQTFNTDPTYGSALGIAWASNWEYSAFVPTNPWRSSMSLVRKFSLNTEYQANPETELINLKA
 EPILNISNAGPWSRFATNTTLTKANSYNVDLSNSTGTLEFELVYAVNTTQTISKSVFADLSLWFKGLEDP EE
 YLRMGFEVSASSFFLD RGN SKVKFVKENPYFTNRMSVNNQPFKSENDLSYYKVYGLLDQNILELYFNDGD
 VVSTNTYFMTTGNALGSVNMTTGVDNLFYIDKFQVREVK

Figura 13. Estructura primaria de la invertasa de *S. cerevisiae*. La secuencia polipeptídica completa consta de 532 aminoácidos y su masa molecular es de 60 kDa. La forma citoplasmática intracelular consta de 512 aminoácidos y su masa molecular es de 58 kDa. Se muestra en azul el péptido señal, en morado las dos metioninas de inicio de la forma extra e intracelular respectivamente y en verde oscuro el dominio C-terminal. Los tres motivos conservados están resaltados en gris y los aminoácidos catalíticos en rojo.

OBJETIVOS

El presente trabajo se enmarca en un proyecto cuyo objetivo final es la búsqueda de vías alternativas para la producción de FOS a nivel industrial. Los **objetivos** concretos que se plantearon en este trabajo fueron:

1. Rastreo y caracterización de nuevos microorganismos productores de enzimas con actividad transfructosilante:

Con la intención de encontrar microorganismos productores de enzimas de la familia GH32 (que incluye invertasas, inulinasas y fructosil transferasas) con alta actividad transfructosilante nos proponemos llevar a cabo el rastreo de levaduras procedentes de nichos ecológicos con alto contenido en inulina y sacarosa. En caso de encontrar microorganismos no identificados, abordaremos su identificación y caracterización. Posteriormente se procederá al clonaje y expresión de nuevos genes de la familia GH32 para determinar su potencial actividad transfructosilante.

2. Análisis estructural y funcional de la invertasa modelo Suc2 de *S. cerevisiae* y mejora de su actividad transfructosilante:

Se abordará la resolución estructural de Suc2 mediante cristalización y difracción de rayos X y en paralelo se realizará un análisis estructural mediante técnicas de modelado estructural, muy útiles en el campo de la ingeniería de enzimas, especialmente a la hora de plantear aproximaciones de mutagénesis dirigida. En el contexto que nos ocupa, se estudiarán las posibilidades de mejorar la capacidad transfructosilante de las enzimas en base a cambios puntuales en el entorno del centro activo. Pretendemos realizar un análisis funcional tanto de las enzimas nativas como de las mutantes mediante expresión heteróloga en *Escherichia coli*. Se ensayará su actividad enzimática y específicamente su capacidad transfructosilante.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 MATERIAL BIOLÓGICO, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

1.1 Estirpes microbianas

Las estirpes microbianas utilizadas en este trabajo, tanto bacterias como levaduras, se enumeran en las Tabla 9 y Tabla 10.

Tabla 9. Hongos y levaduras. N° colec: código de la levadura en la colección particular del Laboratorio de Estructura y Función de Enzimas del IATA.

N° colec.	Levadura	Procedencia	Genotipo/ observaciones
Y1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Colección propia	MAT α wild-type standard (Mortimer y Johnston 1986).
Y163	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741	Colección propia	MAT α <i>his3 leu2 met15</i>
HY45	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Colección propia	Aislada de kefir comercial
HY64	<i>Wickerhamomyces navarrens</i>	Navarra	Aislada de raíces de <i>A. sativum</i> . Depositada como CECT 13056. y CBS 11861
HY65	<i>Wickerhamomyces onychis</i>	CECT 1458	-
-	<i>Aspergillus niger</i>	CECT 2088	-
-	<i>Candida albicans</i> SC5314	CECT 11334	NCBI 237561

Tabla 10. Bacterias (*E. coli*). N° colec: código de la cepa en la colección particular del Laboratorio de Estructura y Función de Enzimas del IATA.

N° colec.	Cepa	Genotipo/ observaciones
B20	DH5 α	F' <i>Phi 80d lacZ Delta M15 Delta(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) phoA supE44 lambda- thi-1</i>
B31	JM109 (DE3)	e14 ⁻ (McrA ⁻) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK⁻ mK⁺) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15] (DE3)</i>
B37	BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dcm (DE3)</i>
B40	BL21(DE3) pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dcm (DE3) pLysS (CmR)</i>
B73	XL1-BLUE (Stratagene)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>
B80	M15	<i>Nal^S Str^S Rif^S Thi⁻ Lac⁻ Ara⁺ Gal⁺ Mtl⁻ F⁻ RecA⁺ Uvr⁺ Lon⁺</i>
B81	SG13009	<i>Nal^S Str^S Rif^S Thi⁻ Lac⁻ Ara⁺ Gal⁺ Mtl⁻ F⁻ RecA⁺ Uvr⁺ Lon⁺</i>
-	ROSETTA2 (Novagen)	F ⁻ <i>ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dcm pRARE2 (Cam^R)</i>

1.2 Cultivo de levaduras.

Los cultivos de levaduras se incubaron a 30°C y en el caso de crecimiento en medio líquido se utilizó agitación orbital a 200 rpm. Las placas de medio sólido se prepararon con 2% de agar bacteriológico. La composición de los distintos medios es la siguiente:

Medio rico (YPD): Extracto de levadura 1%, bactopectona 2%, y glucosa al 2%.

Medio mínimo (SD): Base nitrogenada para levadura (YNB) sin aminoácidos 0.17%, sulfato amónico 0.5% y glucosa 2%.

Medio mínimo con inulina (SI): Base nitrogenada para levadura (YNB) sin aminoácidos 0.17%, sulfato amónico 0.5%, inulina 2%, ampicilina 100 mg/l y cloramfenicol 68 mg/l.

Medio mínimo con sacarosa (SSac): Base nitrogenada para levadura (YNB) sin aminoácidos 0.17%, y sulfato amónico 0.5%. Una vez estéril, se le añade la sacarosa al 2% esterilizada por filtración, ampicilina 100 mg/l y cloramfenicol 68 mg/l.

Medio mínimo con celobiosa (SCel): Base nitrogenada para levadura (YNB) sin aminoácidos 0.17%, y sulfato amónico 0.5%. Una vez estéril, se le añade la celobiosa al 2% esterilizada por filtración, ampicilina 100 mg/l y cloramfenicol 68 mg/l.

Medio rico con celobiosa (YPCel): Extracto de levadura 1% y bactopectona 2%. Una vez estéril, se le añade la celobiosa al 2% esterilizada por filtración.

SPIDER: Manitol 1%, caldo nutritivo 1% y K_2HPO_4 0.2%, pH 7.2.

Los cultivos de levaduras para ensayos de esporulación se realizaron en medio sólido y las placas se incubaron durante 12 semanas a 2 temperaturas diferentes (20 y 25°C). Los medios de cultivo utilizados y su composición se detallan a continuación:

5% Malt extract: Extracto de malta 5% y agar bacteriológico 2%.

YM: Extracto de malta 0.3%, extracto de levadura 0.3%, bactopectona 0.5%, glucosa 1% y agar bacteriológico 2%, pH 5-6.

Acetato (McClary): Glucosa 0.1%, KCl 0.18%, NaAc $3\text{H}_2\text{O}$ 0.82%, extracto de levadura 0.25% y agar bacteriológico 1.5%.

Gorodkowa: Glucosa 0.1%, NaCl 0.5%, peptona 1% y agar bacteriológico 2% en 1 litro de agua del grifo.

Patata-dextrosa: Difco Potato Dextrose Agar 3.9% y agar bacteriológico 0.5%.

1.3 Cultivo de *E. coli*.

Los cultivos de *E. coli* se incubaron durante unas 14 h a 37°C en medio LB (extracto de levadura 0.5%, peptona 1% y cloruro sódico 0.5%) y, en el caso de medios líquidos, con agitación orbital a 250 rpm. Las placas de cultivo se solidificaron con 2% de agar bacteriológico. Para el cultivo de bacterias con plásmidos portadores del gen Amp^R se añadió ampicilina al medio a una concentración final de 100 mg/l. Cuando se utilizaron plásmidos portadores del gen CHL^R, se añadió cloramfenicol a una concentración final de 68 mg/l.

Para la expresión heteróloga de proteínas se utilizó un medio más rico (2XTY) compuesto por extracto de levadura 1%, triptona 1.6% y cloruro sódico 0.5%.

2 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA

2.1 Tratamientos enzimáticos del DNA.

Los tratamientos de digestión con endonucleasas de restricción, desfosforilación de los extremos de vectores de clonación con fosfatasa alcalina y las reacciones de ligación con la T4 ligasa se realizaron siguiendo las recomendaciones descritas en Sambrook et al. 1989.

2.2 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa a una concentración de 0.7%. En la preparación de los geles se utilizó tampón TBE (1x) compuesto por Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 2x (azul de bromofenol 0.25%), xilene cianol 0.25%, glicerol 30% (p/v)). La electroforesis se realizó a voltaje constante entre 2 y 10 V/cm. Las electroforesis con fines preparativos se efectuaron en tampón TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). La agarosa utilizada en estos casos fue de bajo punto de fusión para facilitar la recuperación del DNA. Para la purificación del DNA se utilizó el kit comercial “QIAquick Gel extraction kit” de Qiagen.

El estudio cromosómico mediante cariotipado por CHEF se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Schwartz y Cantor (1984) con las modificaciones de Sor y Fukuhara (1989). La electroforesis se realizó en un equipo LKB 2015 Pulsaphor TM Plus con electrodo hexagonal de 120° de ángulo de campo, en gel de agarosa al 1% en tampón 0.5 x TBE. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 100 V, manteniendo el tampón de la cubeta a 12°C con una ligera agitación que aseguraba una temperatura homogénea. Las fases con que se programó el cambio de orientación del campo se muestran en el siguiente esquema, en el que las flechas indican un incremento lineal de la duración del pulso:

TIEMPO (h)	0	4	8	12	16	24	40	108
PULSOS (s)	20	→ 25	→ 35	→ 55	→ 95	→ 135	→ 135	→ 600

eliminó el DNA genómico precipitado y los restos celulares. El DNA plasmídico se precipitó con 420 µl de isopropanol y 40 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) durante 20 minutos en hielo. Después de centrifugar a 13000 rpm 10 minutos, se lavó el pellet de DNA con 400 µl de etanol al 70% (-20°C). El pellet final se resuspendió en 50 µl de agua con RNAsa (0.6 mg/ml).

2.5 Aislamiento de DNA genómico de levadura.

La obtención de DNA genómico de levadura se llevó a cabo a partir de 5 ml de cultivo en medio YPD siguiendo el método rápido de aislamiento descrito por Polaina y Adam (1991) con las modificaciones introducidas por Latorre-Garcia et al. (2007).

2.6 Amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cebadores utilizados

Los cebadores utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 11.

Tabla 11. Cebadores utilizados en este trabajo.

OLIGO	MER	SECUENCIA	APLICACIÓN
ITS1	19	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Amplificación ITS1-5.8S-ITS2 rDNA
ITS4	20	TCCTCCGCTTATTGATATGC	"
NL1 (AL658)	24	GCAATCAATAAGCGGAGGAAAAG	Amplificación D1/D2 rDNA
NL4 (AL659)	19	GGTCCGTGTTCAAGACGG	"
M13 F (AL654)	17	GTAAACGACGGCCAGT	Secuenciación insertos del vector TOPO
M13 R (AL655)	17	CAGGAAACAGCTATGAC	"
P1 (AL645)	18	CCCGAAAAGTGCCACCTG	Secuenciación insertos del vector pQE-80L
P3 (AL646)	19	GTTCTGAGGTCATTACTGG	"
UW1 (AL627)	25	GCCAATCCGGATNGAYKSNNGNTC	Oligos degenerados para Genome Walking
UW2 (AL628)	25	GCCTTAAGGCCTANGARMSNCCNAG	"

OLIGO	MER	SECUENCIA	APLICACIÓN
UW3 (AL629)	25	CGGTTAAGGCCTANYTCSKNGANGC	"
UW4 (AL630)	25	GCCAATTCCGGATNSAGYMNCTNCG	"
LL438	49	GTGAGCTCAGGAGGGACTATGACAAACGAACTAGCGAT AGACCTTTGG	Amplificación SUC2 para clonar en-PUC18 F
LL439	41	GTGCTAGCTTACTATTTTACTTTCTTACTTTGGAACCTGTC	Amplificación SUC2-para clonar en PUC18 R
LL440	51	GTGAGCTCAGGAGGGACTATGCATCATCATCATCATATA CAAACGAACT	Amplific SUC2 (6HNT) para clonar en PUC18 F
LL441	50	GTGCTAGCTTACTAATGATGATGATGATGATGTTTACTTC CCTTACTTGG	Amplific SUC2 (6HCT) para clonar en-PUC18 R
AL479	43	GGATGAATAACCCAAATGGGTTGTGGTACGATGAAAAAG ATGC	Mutación Suc2 D22N F
AL480	31	AGCCCTTGTTGGGTGTGAAGTGACCAAAGG	Mutación Suc2 D22N R
AL487	34	CAGTGTCAGGTTTGATTGAAGTCCCAACTGAGC	Mutación Suc2 E203Q F
AL488	30	GTATTGGTAGCCTAAGAAACCTTCGTTGGC	Mutación Suc2 E203Q R
AL491	43	GGCGTGTGGGAATGTCCAGGTTTGATTGAAGTCCCACT GAGC	Mutación Suc2 GVW
AL492	37	GCCTAAGAAACCTTCGTTGGCAAATGCAGATTCTAGC	Mutación Suc2 GVW
AL493	51	ATTGCGGAAGTGCATAAAATTGAAATTTACTCCTCTGATG ACTTGAAGTCC	Mutación Suc2 VVV
AL494	54	GCTGGTCACCACCACCCATTTTGAAGGTTTCATACCAG AACACCTTTGGATC	Mutación Suc2 VVV
AL495	44	ATTACATATGATGACAAACGAACTAGCGATAGACCTTTG GTCC	Amplific Suc2 para clonar en vector PET F
AL497	40	TTAGCTCAGCCTATTTTACTTCCCTTACTTGAACCTGTC	Amplific Suc2 para clonar en vector PET R
AL498	34	GGTAAGCTAAGGTCAAGTTTGTCAAGGAGAACC	Cebador utilizado para secuenciar
AL499	33	GGGCCCGACGTGCGATGCTCCCGCCGCCATGG	Amplific Suc2 para clonar en vector PGEMT F
AL500	33	CCCGGGCTGCAGCGTACGAGGGCCGCGGTACC	Amplific Suc2 para clonar en vector PGEMT R
AL529	42	GTTAAGCTTTTACTATTTTACTTCCCTTACTTGGAACTGT C	Amplific Suc2 para clonar en vector PQE-80 R
AL530	36	GTGAGCTCACAAACGAACTAGCGATAGACCTTTGG	Amplific Suc2 para clonar en vector PQE-80 F
AL557	20	TTYGARGAYMGIAARTTYGC	Degenerado URA3 F
AL558	14	CKRTAYTGYTGICC	Degenerado URA3 R
AL559	14	CKRTAYTGYTGNCC	Degenerado URA3 R
AL591	20	TKBATGAAYGAYCCIAAYGG	Degenerado Forward familia GH32
AL592	19	TAYTSCCARTTIBWIGCCC	Degenerado Reverse familia GH32
AL595	18	CAAGTCACAATATGCAGG	Genome Walking para gen URA3-NAV F
AL596	17	GCCGATATCACAATGC	Genome Walking para gen URA3-NAV F
AL597	17	CCTTCGGTATTGTTGGC	Genome Walking para gen URA3-NAV R
AL608	25	GTGGATCCGATGGTGACAGCAAGGC	Amplific inulinasa para clonar en vector PQE-80 F
AL609	26	GGTAAGCTTTCAACGTTAAATTGGG	Amplific inulinasa para clonar en vector PQE-80 R
AL622	17	GCATTTGTGATATCGGC	Genome Walking para gen URA3-NAV R
AL623	15	CCTTGAACAATACCG	Genome Walking para gen URA3-NAV R
AL624	19	GCATTAGTAGACCTCTTGG	Genome Walking para gen URA3-NAV R
AL625	26	CAGTGTCAGGTTTGATTGAAGTCCC	Mutación Suc2 E203Q F
AL626	25	GTATTGGTAGCCTAAGAAACCTTCG	Mutación Suc2 E203Q R

OLIGO	MER	SECUENCIA	APLICACIÓN
AL631	16	GCTACTAGATTCATGG	Genome Walking para gen INV-NAV
AL632	18	CGGTCAGGTCGGGTTAGC	Genome Walking para gen INV-NAV
AL633	17	CCAATATAGAGGCAACC	Genome Walking para gen INV-NAV
AL634	16	CGATCGTAGAACATCC	Genome Walking para gen INV-NAV
AL650	17	ATGGTCTCTACGCTGAC	Amplificación gen URA3 F
AL651	19	TCATTGTTGACCAGTTCTC	Amplificación gen URA3 R
AL664	31	GTGAGCTCTCACAATAATCGTCCTTAGG	Amplific gen completo INV NAV F
AL665	29	GTTAAGCTTTCAAATGATCAATTTGTTGG	Amplific gen completo INV NAV R
AL675	22	TTGACTTAACCTCAGAAGACGC	Amplificación RPS0 5A
AL676	23	ATGTCATTACCAGCTTCATTTGA	Amplificación RPS0 5C
AL677	24	TCTGTAGAAGTACAAATCTGGCAT	Amplificación RPS0 3B
AL678	20	GCAGTAGCACCAGTGTGAGC	Amplificación RPS0 3C
AL681	31	GTGAGCTCTTCAACTATGACCAGCCTTACCG	Amplific transferasa <i>A. niger</i> F
AL682	34	ATTGGTACCTTAATTCACGTCGAAGTAATTTG	Amplific transferasa <i>A. niger</i> R
AL683	31	GTGAGCTCTTCAACTATGACCAGCCTTATCG	Amplific exo-inulinasa <i>A. awamori</i> F
AL684	34	ATTGGTACCTCAATTCACGTCGAAGCAATCTTG	Amplific exo-inulinasa <i>A. awamori</i> R
AL704	23	ATGAATGACCCAAATGGGTTGTG	Mutación Suc2 W19Y F
AL705	24	ATAGCCCTTGTGGGTGTGAAGTG	Mutación Suc2 W19Y R
AL706	24	AGCGACCCAAATGGGTTGTGGTAC	Mutación Suc2 N21S F
AL707	22	CATCCAGCCCTTGTGGGTGTG	Mutación Suc2 N21S R
AL708	28	AGCGGGTTGTGGTACGATGAAAAAGATG	Mutación Suc2 N24S F
AL709	22	TGGGTCATTATCCAGCCCTTG	Mutación Suc2 N24S R
AL710	27	ATGAGCGACCCAAATGGGTTGTGGTAC	Mutación Suc2 W19Y/N21S F
AL711	31	ATGAATGACCCAAGCGGTTGTGGTACGATG	Mutación Suc2 W19Y/N24S F
AL712	31	ATGAGCGACCCAAGCGGTTGTGGTACGATG	Mutación Suc2 W19Y/N21S/ N24S F
AL713	26	TATGCTTCAAACCTGGGAGTACAGTGC	Mutación Suc2 W287Y F
AL714	22	GGCAATACCTAATGCTGAACCG	Mutación Suc2 W287Y R
AL715	23	TATGAGTACAGTGCCTTTGTCCC	Mutación Suc2 W291Y F
AL716	21	GTTTGAAGCCCAGGCAATACC	Mutación Suc2 W291Y R
AL717	26	GCCCCAGGCAATACCTAATGCTGAAC	Mutación Suc2 A288G/ S289Δ/ N290Δ/ W291Y
AL730	22	TGGTCTGGCTCCATGGTGGTTG	Mutación Suc2 F82W F
AL731	22	AGCACCTGAATCGTTACGCTTG	Mutación Suc2 F82W R
AL732	23	GTGGGTTTGATTGAAGTCCCAAC	Mutación Suc2 P205V F
AL733	22	ACATTCGTATTGGTAGCCTAAG	Mutación Suc2 P205V R
AL734	20	CGCCAGGTGCACCTGCTGG	Mutación Suc2 N228R F
AL735	26	GATAGAAATAACATGACCCAATAAG	Mutación Suc2 N228R R
AL736	20	GCGCCAGGTGCACCTGCTGG	Mutación Suc2 N228A F

En las reacciones de amplificación se utilizaron 3-5 unidades/μl de la polimerasa más adecuada para cada ensayo en función del tipo de aplicación (tamaño del fragmento de DNA a amplificar y necesidad o no de corregir


errores durante la amplificación) (Tabla 4). La mezcla de reacción contenía además dNTPs 0.2 mM, los oligonucleótidos cebadores 0.2 μ M y DNA molde a concentración 1-10 ng/ml. La concentración de $MgCl_2$ en el tampón de reacción apropiado varió entre 1 y 5 mM según la DNA polimerasa utilizada.

Tabla 4. Polimerasas utilizadas para la amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR.

Enzima	Casa comercial	Actividad correctora exonucleasa 3'-5' (Proofreading)	Capacidad amplificación	Activi. transferasa terminal
Expand High Fidelity	Roche	SI	Hasta 9 kb	SI
Pfu Ultra II Fusion	Stratagene	SI	Hasta 15 kb	NO
Netzyme®	Need	NO	Hasta 2 kb	SI
Paq5000	Stratagene	NO	Hasta 6 kb	SI
Easy A	Stratagene	SI	Hasta 10 kb	SI

Amplificación del DNA ribosómico

A partir de DNA genómico, se amplificaron por PCR las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y el dominio D1/D2 del DNA ribosómico. Se utilizaron para ello los cebadores ITS1, ITS4, NL1 y NL4 (Tabla 11) junto con la DNA polimerasa Netzyme con las condiciones de reacción que se detallan a continuación:

94°C	94°C	55°C	72°C	72°C
5 min	1 min	30 s	1 min	8 min
				
35 ciclos				

Las reacciones de PCR para cada región se hicieron por triplicado en cada levadura con el fin de aumentar las probabilidades de recuperar una secuencia correcta, teniendo en cuenta las posibles modificaciones en la secuencia amplificada por errores de la polimerasa. Los productos de PCR se purificaron y se secuenciaron.

Amplificación del gen *INV1* y *URA3* de *W. navarrensis*

Amplificación de una secuencia central del gen con cebadores degenerados. A partir de alineamientos de secuencia de genes que codifican invertasas e inulinasas de la familia GH32, así como de genes *URA3* que codifican Orotidina 5'-phosphato descarboxilasas, se diseñaron cebadores degenerados, uno directo y otro reverso para cada caso (Tabla 11, Figura 15 y Figura 16).

DIRECTO AL591: 5' TKBATGAAYGAYCCIAAYGG 3'

W/F	M	N	D	P	N	G
5' TGG	ATG	AAC	GAC	CCA	AAC	GG 3'
TC		T	T	C	T	
T				G		
				T		
5'TKB	ATG	AAY	GAY	CCI	AAY	GG 3'

REVERSO AL592: 5' TAYTSCCARTTIBWIGCCC 3'

W	A	S/N	N	W	E/Q	Y
3'ACC	CGA	TCA	TTG	ACC	CTT	AT 5'
	T	AGT	A		G C	
	G	TG				
	C	C				
3'CC	CGI	WBI	TTR	ACC	STY	AT 5'

Figura 15. Diseño de cebadores degenerados a partir de alineamientos de secuencias de genes de la familia GH32. En negrita se muestran motivos conservados en la secuencia polipeptídica. En el recuadro central se indican los diferentes codones que codifican cada residuo y en la inferior las secuencias de los cebadores degenerados.

DIRECTO AL557: 5'TTYGARGAYMGIAARTTYGC 3'

F	E	D	R	K	F	A
5'TTC	GAA	GAC	AGA	AAA	TTC	GCA 3'
T	G	T	C C	G	T	C
			G			G
			T			T
5'TTY	GAR	GAY	MGI	AAR	TTY	GC 3'

REVERSO AL558: 5'CKRTAYTGYTGICC 3'

G	Q	Q	Y	R
3'CCT	GTT	GTT	ATG	TCT 5'
G	C	C	A	G G
C				C
A				A
3'CC I	GTY	GTY	ATR	KC 5'

Figura 16. Diseño de cebadores degenerados a partir de alineamientos de secuencias de genes *URA3*. En negrita se muestran motivos conservados en la secuencia polipeptídica. En el recuadro central se indican los diferentes codones que codifican cada residuo y en la inferior las secuencias de los cebadores degenerados.

Con ellos se amplificaron unas 800 pb de la región central del gen *INV1* y unas 400 pb del gen *URA3*. La DNA polimerasa utilizada fue la Expand High Fidelity y las condiciones de la PCR se detallan en la Ilustración 1. El producto de PCR se purificó a partir de gel de agarosa y se insertó en el vector pCRII-TOPO siguiendo las especificaciones del fabricante. Posteriormente se transformó la cepa de *E. coli* XL1-BLUE, se aisló el DNA plasmídico y los clones con insertos se secuenciaron utilizando los cebadores M13F y M13R (Tabla 11).

“Genome Walking”. A partir de la secuencia conocida de la parte central del gen, se diseñaron cebadores específicos orientados hacia los extremos de dicho gen con el fin de amplificar las zonas 5'y 3'. Los cebadores utilizados (Tabla 11) para el gen *INV* fueron AL631, AL632, AL633

y AL634 (Figura 17) y para el *URA3* AL622, AL623, AL624, AL595 y AL596 (Figura 18).

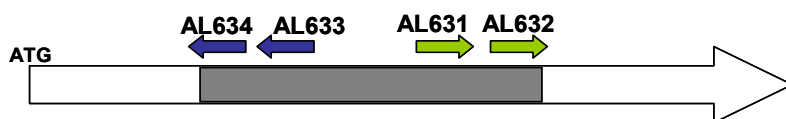


Figura 17. Esquema del gen de la invertasa de *W. navarrensis*. La zona sombreada es la zona conocida del gen gracias a la amplificación con cebadores degenerados y su posterior secuenciación.

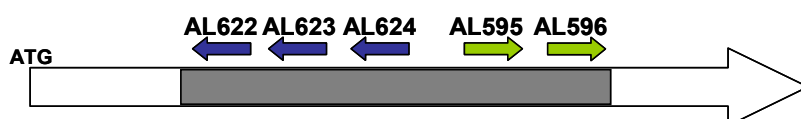


Figura 18. Esquema del gen *URA3* de *W. navarrensis*. La zona sombreada es la zona conocida del gen gracias a la amplificación con cebadores degenerados y su posterior secuenciación.

A partir de una variante de la técnica del Genome Walking (Guo y Xiong 2006) (Figura 19) mediante rondas sucesivas de PCR utilizando cebadores específicos y universales (Tabla 11) que hibridan en zonas aleatorias del DNA genómico (UW1, UW2, UW3 y UW4), se llegó a conocer la secuencia completa de los genes *INV* y *URA3* de *W. navarrensis*.

Se realizaron 2 rondas de PCR sucesivas, donde el producto de la PCR I fue el molde de la PCR II. La DNA polimerasa utilizada fue la Paq5000 con la técnica de “PCR touchdown” disminuyendo la temperatura de hibridación en 0.5°C cada ciclo durante los 25 primeros (desde 60 hasta 47.5°C), y con las condiciones que se detallan a continuación:

95°C	95°C	60-47.5°C	72°C	95°C	50°C	72°C	72°C
2 min	45 s	45 s	2 min	45 s	45 s	2 min	7 min
25 ciclos				35 ciclos			

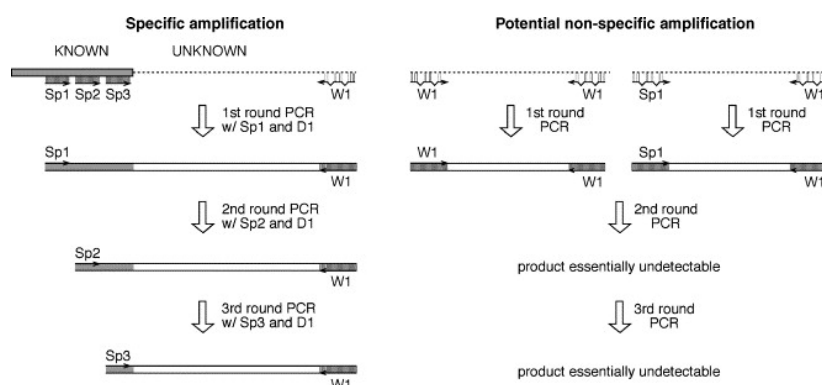


Figura 19. Esquema de la técnica de “Genome Walking”, basada en PCR anidada que suprime potenciales amplificaciones inespecíficas artefactuales. Consta de tres rondas (a veces dos) de PCR con un cebador parcialmente degenerado (W1) y una serie de cebadores específicos (Sp1, Sp2 y Sp3) que hibridan en la región conocida del gen. Los productos específicos son preferencialmente amplificados con esta estrategia mientras que cualquier potencial producto de PCR artefactual es eliminado después de la segunda o tercera ronda de la reacción. Las áreas sombreadas son regiones de secuencia conocida. Tomado de Guo y Xiong (2006).

El producto de la PCR II se clonó en el vector pCRII-TOPO. Con la construcción resultante se transformó XL1-BLUE, se purificó el DNA plasmídico y se secuenció el inserto con los cebadores M13F y M13R (Tabla 11). Las secuencias se ensamblaron junto con la región central conocida obteniéndose los dos genes completos. Posteriormente se diseñaron los cebadores AL664 y AL665 del gen *INV1* y el AL650 y AL651 del *URA3* (Tabla 11) para la amplificación del gen completo del mismo modo que se detalla en el apartado siguiente.

Amplificación de los genes *SUC2* de *S. cerevisiae*, *INU1* de *K. marxianus* e *INU1* de *A. niger*

A partir de DNA genómico, se amplificó por PCR el gen *SUC2* que codifica la invertasa (P00724) de *S. cerevisiae* utilizando los cebadores AL529-AL530 y para *INU1* que codifica para la inulinasa (P28999) de *K. marxianus* con los cebadores AL608-AL609. La DNA polimerasa utilizada fue

la Expand High Fidelity y las condiciones de la PCR se detallan en la Ilustración 1.

94°C	94°C	55°C	72°C	94°C	55°C	72°C	72°C
2 min	30 s	30 s	2 min	30 s	30 s	2 min *	7 min
10 ciclos				20 ciclos			

Ilustración 1. Condiciones utilizadas en la PCR con la enzima Expand High Fidelity. * indica un incremento en el tiempo de extensión de 5 segundos cada nuevo ciclo.

Con el fin de obtener el gen de la Exo-inulinasa de *A. niger* sin intrones en su secuencia, se procedió a su amplificación a partir de cDNA utilizando el kit “SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR” de Invitrogen. Para ello, se mezclaron 10 µg (22 µl) de RNA total, extraído según lo descrito en Crespo-Sempere et al. (2010) con 2 µl de oligo dT (12-18) y 2 µl dNTP’s mix (10 mM), se incubaron 5 minutos a 65°C y luego 1 minuto en hielo. Se añadieron 8 µl de 5X First Strand Buffer, 2 µl de DTT 0.1 M, 2 µl RNasa OUT (40 U/µl), 2 µl de SuperScript III RT y se incubó la mezcla resultante a 50°C durante toda la noche. La reacción se detuvo calentando a 70°C durante 15 minutos. A partir del cDNA obtenido, se amplificó por PCR el gen *INU1* que codifica la Exo-inulinasa (A2R0E0) de *A. niger* utilizando los cebadores AL681 y AL682 (Tabla 11). La DNA polimerasa utilizada fue la Pfu Ultra II Fusion y las condiciones de la PCR se detallan a continuación:

95°C	95°C	55°C	72°C	72°C
1 min	20 s	20 s	1 min	3 min
40 ciclos				

Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida se realizó según una adaptación del protocolo descrito por Hemsley et al. (1989). Este método consiste en amplificar y religar la secuencia completa de un plásmido portador del gen o fragmento que se pretende mutagenizar con dos oligonucleótidos divergentes, cuyos

puntos de inicio están situados en posiciones nucleotídicas adyacentes, uno de los cuales contiene la mutación a introducir (Figura 20). Esta misma estrategia se sigue para crear deleciones, excluyendo en la secuencia del cebador los nucleótidos que se desean deletar.

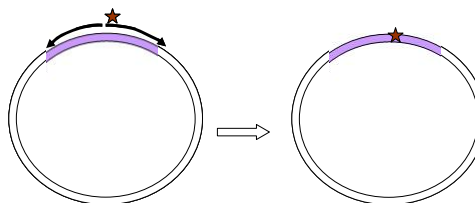



Figura 20. Esquema del proceso de mutagénesis dirigida. La zona de color morado representa el gen *SUC2*. La construcción a mutagenizar (vector + gen *SUC2*) se amplifica con dos oligonucleótidos adyacentes y divergentes (flechas negras) uno de los cuales se ha diseñado con la mutación a introducir (estrella). El plásmido circular se recupera tras fosforilar y autoligar el fragmento amplificado que contiene la mutación (Hemsley et al. 1989).

La amplificación se realizó con una DNA polimerasa con prueba de lectura que produce extremos romos (Pfu Ultra II Fusion). Las condiciones de reacción se detallan a continuación:

95°C	95°C	60°C	72°C	72°C
5 min	30 s	30 s	2 min	8 min
<div style="text-align: center;">  30 ciclos </div>				

El DNA lineal recuperado como producto de la amplificación por PCR se fosforiló con polinucleótido quinasa (Roche), se autoligó con T4 DNA ligasa (Fermentas) y con el plásmido circular resultante se transformó *E. coli*. La presencia de las mutaciones diseñadas y la ausencia de mutaciones no deseadas se verificó mediante secuenciación del gen completo.

2.7 Plásmidos construidos

Todos los plásmidos que se han construido en este trabajo están enumerados en la Tabla 12.

Tabla 12. Plásmidos utilizados en este trabajo. Se describen brevemente las características más importantes de cada construcción y su procedencia. Los códigos (PNNN) indican el número de serie del plásmido en la colección particular del Laboratorio de Estructura y Función de Enzimas del IATA.

Plásmido	Descripción	Nº Colección
pUC18- <i>SUC2</i>	Plásmido pUC18 con un inserto <i>SacI/NheI</i> de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i>	P1032
pUC18- <i>suc2</i> D22N	Plásmido pUC18 con un inserto <i>SacI/NheI</i> de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con una mutación: D22N	
pUC18- <i>suc2</i> GVW	Plásmido pUC18 con un inserto <i>SacI/NheI</i> de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con tres mutaciones: Y200G, Q201V, Y202W.	P3044
pUC18- <i>suc2</i> VVV	Plásmido pUC18 con un inserto <i>SacI/NheI</i> de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con 10 mutaciones: I164V, M165V, T166V, A167T, A168S, K169I, S170A, Q171E, D172L, Y173H	P3045
pET- <i>SUC2</i>	Plásmido pET-3b con un inserto <i>NdeI/Bpu1102I</i> de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> .	P3046, 3047
pQE80- <i>SUC2</i>	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto <i>SacI/HindIII</i> de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i>	P3062, 3064
pQE80- <i>suc2</i> Δ	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto <i>SacI/KpnI</i> de 1 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> deletado	
pQE80- <i>suc2</i> D22N	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto <i>SacI/HindIII</i> de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con una mutación: D22N	P3063
pQE80- <i>suc2</i> E203Q	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto <i>SacI/HindIII</i> de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con una mutación: E203Q.	P3082
pQE80- <i>suc2</i> GVW	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto <i>SacI/HindIII</i> de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con tres mutaciones: Y200G, Q201V, Y202W.	P3071 P3086
pQE80- <i>suc2</i> VVV	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto <i>SacI/HindIII</i> de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con 10 mutaciones: I164V, M165V, T166V, A167T, A168S, K169I, S170A, Q171E, D172L, Y173H	P3072 P3087

Plásmido	Descripción	Nº Colección
pQE80- <i>suc2</i> GVW-VVV	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto SacI/HindIII de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con 13 mutaciones: : I164V, M165V, T166V, A167T, A168S, K169I, S170A, Q171E, D172L, Y173H, Y200G, Q201V, Y202W	P3089
pQE80- <i>suc2</i> W19Y	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto SacI/HindIII de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con una mutación: W19Y.	P3110 P3121
pQE80- <i>suc2</i> N21S	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto SacI/HindIII de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con una mutación: N21S.	P3111 P3122
pQE80- <i>suc2</i> N24S	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto SacI/HindIII de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con una mutación: N24S.	P3112 P3123
pQE80- <i>suc2</i> W19Y/N21S	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto SacI/HindIII de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con dos mutaciones: W19Y y N21S.	P3113 P3124
pQE80- <i>suc2</i> W19Y/N24S	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto SacI/HindIII de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con dos mutaciones: W19Y y N24S.	P3114 P3125
pQE80- <i>suc2</i> W19Y/N21S/N24S	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto SacI/HindIII de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con tres mutaciones: W19Y, N21S y N24S.	P3115 P3126
pQE80- <i>suc2</i> W287Y	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto SacI/HindIII de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con una mutación: W287Y.	P3120 P3127
pQE80- <i>suc2</i> W291Y	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto SacI/HindIII de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con una mutación: W291Y.	P3117 P3128
pQE80- <i>suc2</i> WGY	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto SacI/HindIII de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con cuatro mutaciones: A288G, S289Δ, N290Δ y W291Y.	P3118 P3129
pQE80- <i>suc2</i> F82W	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto SacI/HindIII de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con una mutación: F82W	P3130 P3142
pQE80- <i>suc2</i> P205V	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto SacI/HindIII de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con una mutación: P205V.	P3131 P3143
pQE80- <i>suc2</i> N228R	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto SacI/HindIII de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con una mutación: N228R.	P3132 P3133 P3144
pQE80- <i>suc2</i> N228A	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto SacI/HindIII de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con una mutación: N228A.	P3134 P3145

Plásmido	Descripción	Nº Colección
pQE80- <i>suc2</i> N21S/F82W	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto <i>SacI</i> / <i>HindIII</i> de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con dos mutaciones: N21S y F82W.	P3135 P3146
pQE80- <i>suc2</i> W19Y/N21S/P205V	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto <i>SacI</i> / <i>HindIII</i> de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con tres mutaciones: W19Y, N21S y P205V.	P3136 P3137 P3147
pQE80- <i>suc2</i> N21S/N228R	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto <i>SacI</i> / <i>HindIII</i> de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con dos mutaciones: N21S y N228R.	P3138 P3139 P3148
pQE80- <i>suc2</i> N21S/N228A	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto <i>SacI</i> / <i>HindIII</i> de 1.5 kb que contiene el gen <i>SUC2</i> con dos mutaciones: N21S y N228A.	P3140 P3141 P3149
pQE80- <i>INUL</i>	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto <i>BamHI</i> / <i>HindIII</i> de 1.5 kb que contiene el gen de la Inulinasa de <i>K. marxianus</i> HY45.	P3068, 3070
pQE80- <i>INV-NAV</i>	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto <i>SacI</i> / <i>HindIII</i> de 1.5 kb que contiene el gen de la Invertasa de <i>W. navarrensis</i> .	P3088
pQE80- <i>EXO-INU A1. A. Niger</i>	Plásmido pQE80 (6His en el extremo amino terminal) con un inserto <i>SacI</i> / <i>KpnI</i> de 1.5 kb que contiene el gen <i>Transf</i> de <i>A. niger</i> .	P119

pUC18-*SUC2*

La región del gen *SUC2* (GeneBank CAA24618.1) que codifica la invertasa intracelular de *S. cerevisiae* fue amplificada mediante PCR a partir de DNA genómico de la cepa Y1. Los cebadores utilizados para la amplificación del gen fueron LL438 y LL439 que contienen los sitios de restricción *SacI* y *NheI* respectivamente. LL438 incorpora además una secuencia Shine-Dalgarno para la unión del ribosoma. El fragmento de DNA amplificado de 1.5 kb de tamaño y digerido con *SacI*/*NheI* fue clonado en el plásmido pUC18.

pUC18-*suc2* D22N

A partir del plásmido pUC18-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó el Asp22 por una Asn. Se utilizaron los cebadores AL479 y AL480.

pUC18-*suc2* GVW

A partir del plásmido pUC18-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se realizó la triple sustitución Y200G, Q201V, Y202W. Se utilizaron los cebadores AL491 y AL492.

pUC18-*suc2* VVV

A partir del plásmido pUC18-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se realizaron las siguientes sustituciones: I164V, M165V, T166V, A167T, A168S, K169I, S170A, Q171E, D172L, Y173H. Se utilizaron los cebadores AL493 y AL494.

pET-*SUC2*

A partir del plásmido pUC18-*SUC2* el gen *SUC2* se amplificó con los cebadores AL495 y AL497 que contienen los sitios de restricción NdeI y BPU1102I respectivamente. El fragmento de DNA amplificado de 1.5 kb de tamaño y digerido con NdeI/BPU1102I fue clonado en el plásmido pET-3b.

pQE80-*SUC2*

La región del gen *SUC2* que codifica la invertasa intracelular de *S. cerevisiae* fue amplificada mediante PCR a partir de DNA genómico de la cepa Y1. Los cebadores utilizados para la amplificación del gen fueron AL530 y AL529 que contienen los sitios de restricción SacI y HindIII respectivamente. El fragmento de DNA amplificado de 1.5 kb de tamaño y digerido con SacI/HindIII fue clonado en el plásmido pQE-80L.

pQE80-*suc2*Δ

A partir del plásmido pQE80-*SUC2*, se digirió el gen *SUC2* con SacI y KpnI que libera el dominio amino-terminal de *SUC2* (fragmento de 1.1 kb) que se clonó en el vector pQE-80L.

pQE80-*suc2* D22N

A partir del plásmido pUC18-*suc2* D22N, se amplificó el gen *suc2* con los cebadores AL530 y AL529 que contienen los sitios de restricción SacI y HindIII respectivamente. El fragmento de DNA amplificado de 1.5 kb de tamaño y digerido con SacI/HindIII fue clonado en el plásmido pQE-80L.

pQE80-*suc2* E203Q

A partir del plásmido pQE80-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó el Glu203 por una Gln. Se utilizaron los cebadores AL625 y AL626.

pQE80-*suc2* GVW

A partir del plásmido pUC18-*suc2* GVW, se amplificó el gen *suc2* GVW con los cebadores AL530 y AL529 que contienen los sitios de restricción *SacI* y *HindIII* respectivamente. El fragmento de DNA amplificado de 1.5 kb de tamaño y digerido con *SacI*/*HindIII* fue clonado en el plásmido pQE-80L.

pQE80-*suc2* VVV

A partir del plásmido pUC18-*suc2* VVV, se amplificó el gen *suc2* VVV con los cebadores AL530 y AL529 que contienen los sitios de restricción *SacI* y *HindIII* respectivamente. El fragmento de DNA amplificado de 1.5 kb de tamaño y digerido con *SacI*/*HindIII* fue clonado en el plásmido pQE-80L.

pQE80-*suc2* GVW-VVV

A partir del plásmido pQE80-*suc2* GVW, mediante mutagénesis dirigida, se realizaron las siguientes sustituciones I164V, M165V, T166V, A167T, A168S, K169I, S170A, Q171E, D172L, Y173H. Se utilizaron los cebadores AL493 y AL494.

pQE80-*suc2* W19Y

A partir del plásmido pQE80-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó el Trp19 por Tyr. Se utilizaron los cebadores AL704 y AL705.

pQE80-*suc2* N21S

A partir del plásmido pQE80-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó la Asn21 por Ser. Se utilizaron los cebadores AL706 y AL707.

pQE80-*suc2* N24S

A partir del plásmido pQE80-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó la Asn24 por Ser. Se utilizaron los cebadores AL708 y AL709.

pQE80-*suc2* W19Y N21S

A partir del plásmido pQE80-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó el Trp19 por Tyr y la Asn21 por Ser. Se utilizaron los cebadores AL710 y AL705.

pQE80-*suc2* W19Y N24S

A partir del plásmido pQE80-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó el Trp19 por Tyr y la Asn24 por Ser. Se utilizaron los cebadores AL711 y AL705.

pQE80-*suc2* W19Y N21S N24S

A partir del plásmido pQE80-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó el Trp19 por Tyr, y las Asn21 y 24 por Ser. Se utilizaron los cebadores AL712 y AL705.

pQE80-*suc2* W287Y

A partir del plásmido pQE80-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó el Trp287 por Tyr. Se utilizaron los cebadores AL713 y AL714.

pQE80-*suc2* W291Y

A partir del plásmido pQE80-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó el Trp291 por Tyr. Se utilizaron los cebadores AL715 y AL716.

pQE80-*suc2* WGY

A partir del plásmido pQE80-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyeron los residuos Ala288 y Trp291 por Gly y Tyr respectivamente, y se delecionaron la Ser289 y Asn290. Se utilizaron los cebadores AL715 y AL717.

pQE80-*suc2* F82W

A partir del plásmido pQE80-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó la Phe82 por un Trp. Se utilizaron los cebadores AL730 y AL731.

pQE80-*suc2* P205V

A partir del plásmido pQE80-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó la Pro205 por Val. Se utilizaron los cebadores AL732 y AL733.

pQE80-*suc2* N228R

A partir del plásmido pQE80-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó la Asn228 por Arg. Se utilizaron los cebadores AL734 y AL735.

pQE80-*suc2* N228A

A partir del plásmido pQE80-*SUC2*, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó la Asn228 por Ala. Se utilizaron los cebadores AL735 y AL736.

pQE80-*suc2* N21S F82W

A partir del plásmido pQE80-*suc2* N21S, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó la Phe82 por un Trp. Se utilizaron los cebadores AL730 y AL731.

pQE80-*suc2* W19Y N21S P205V

A partir del plásmido pQE80-*suc2* W19Y N21S, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó la Pro205 por Val. Se utilizaron los cebadores AL732 y AL733.

pQE80-*suc2* N21S N228R

A partir del plásmido pQE80-*suc2* N21S, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó la Asn228 por Arg. Se utilizaron los cebadores AL734 y AL735.

pQE80-*suc2* N21S N228A

A partir del plásmido pQE80-*suc2* N21S, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó la Asn228 por Ala. Se utilizaron los cebadores AL735 y AL736.

pQE80-*INUL*

La región del gen *INU* que codifica la inulinasa de *K. marxianus* (GenBank CAA48500.1) fue amplificada mediante PCR a partir de DNA genómico de la cepa HY45. Los cebadores utilizados para la amplificación del gen fueron AL608 y AL609 que contienen los sitios de restricción BamHI y HindIII respectivamente. El fragmento de DNA amplificado de 1.5 kb de tamaño y digerido con BamHI/HindIII, que no contiene el péptido señal fue clonado en el plásmido pQE-80L.

pQE80-*INV-NAV*

La región del gen *INV1* que codifica la invertasa de *W. navarrensis* fue amplificada mediante PCR a partir de DNA genómico de la cepa HY64. Los cebadores utilizados para la amplificación del gen fueron AL664 y AL665 que contienen los sitios de restricción SacI y HindIII respectivamente. El fragmento de DNA amplificado de 1.5 kb de tamaño, y digerido con SacI/HindIII, que no contiene el péptido señal fue clonado en el plásmido pQE-80L.

pQE80-*EXO-INU A1. A. Niger*

La región del gen *INU1* que codifica la Exo-inulinasa (GenBank CAK41278.1) de *A. niger* fue amplificada mediante PCR a partir de cDNA obtenido del RNA de la cepa de *A. niger* CECT 2088. Los cebadores utilizados para la amplificación del gen fueron AL681 y AL682 que contienen los sitios de restricción SacI y KpnI respectivamente. El fragmento de DNA amplificado de 1.6 kb de tamaño y digerido con SacI/KpnI, que no contiene el péptido señal fue clonado en el plásmido pQE-80L.

2.8 Análisis de secuencias

La secuenciación de DNA se realizó en el “Servei Central de Suport a la Investigació Experimental” (SCSIE) de la Universitat de València. Para el análisis de las secuencias se utilizaron los programas DNAMAN Versión 4.03 (Lynnon Biosoft®), GeneRunner (Hastings Software®) y Bioedit (Hall 1999). La búsqueda de secuencias homólogas se realizó mediante análisis BLAST utilizando la base de datos GenBank (Altschul et al. 1990, Altschul et al. 1997) y UNIPROT (<http://www.uniprot.org>).

Los análisis filogenéticos moleculares fueron realizados utilizando distintos programas y servidores online. Los alineamientos en formato FASTA que fueron realizados con el programa Bioedit se incorporaron al programa online BIONJ localizado dentro del servidor www.phylogeny.fr. Los parámetros para crear el árbol fueron: número de Bootstraps 1000, “Kimura 2 parameters” como modelo de sustitución y un ratio transición/transversión de 2 (Dereeper et al. 2008, Elias y Lagergren 2007, Felsenstein 1989, Gascuel 1997). El archivo descargado en formato Newick se procesó con el programa MEGA versión 4 para diseñar el árbol definitivo (Tamura et al. 2007).

3 RASTREO DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE INVERTASAS E INULINASAS

Se recolectaron plantas de *Allium sativum* (ajo) y *Allium cepa* (cebolla) procedentes de un huerto situado en el término municipal de Ribaforada (Navarra) con el fin de aislar levaduras productoras de invertasas e inulinasas. Se recogió tierra asociada a raíces de estas plantas (20 g) y con ella se inocularon matraces con 30 ml de medio SI o SSac que se mantuvieron en agitación (200 rpm) a 30°C durante 24 horas. Se inoculó un segundo matraz con 1.5 ml del primero y se volvió a incubar 24 horas a 30°C. Del mismo modo, a partir del segundo matraz se inoculó un tercero. Tras 24 horas a 30°C, se sembraron 100 µl de este último en placas SI o SSac y se dejaron crecer a temperatura ambiente durante 72 h (Figura 21). Se seleccionaron 6 colonias de levadura en base a su divergente morfología y coloración y se sembraron en placa y medio líquido YPD.

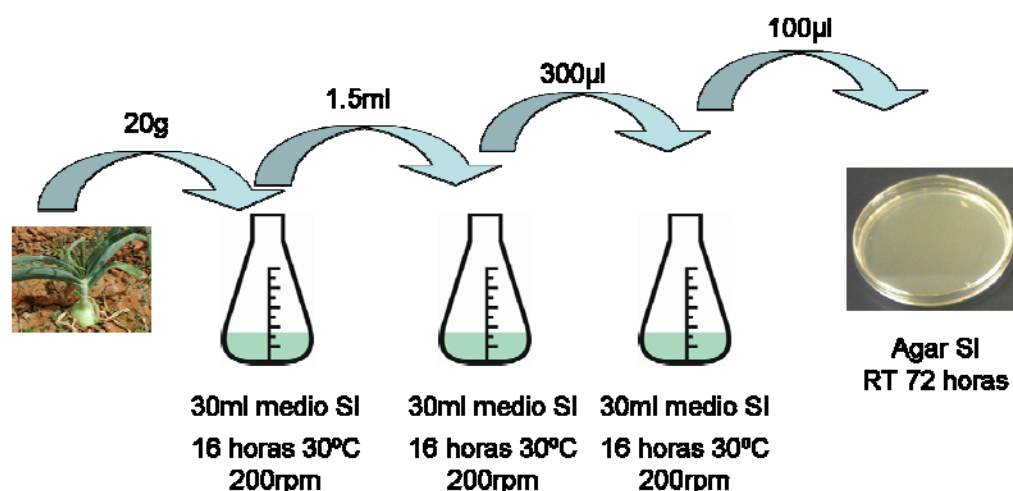


Figura 21. Esquema que se siguió para el aislamiento de levaduras a partir de tierra asociada a raíces de *Allium sativum* y *Allium cepa*.

La caracterización bioquímica se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones descritas en Yarrow (1998).

4 CITOMETRÍA DE FLUJO

Se incubaron los cultivos de levadura por triplicado en 1 ml de YPD durante 38 h a 30°C y posteriormente 6 h a 4°C. Se hizo una dilución del cultivo 1/20 en 1 litro de PBS estéril (130 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) y se añadió SDS 0.5%. Tras centrifugar 5 min a 4000 rpm, se disolvió el sedimento en 1 ml de etanol 70% a -20°C y se incubó 30 min a -20°C. El sedimento resultante tras centrifugar 5 min a 4000 rpm se lavó con 1 ml de PBS y tras una nueva centrifugación, se resuspendió en 250 µl de PBS con RNasa 0.1 mg/ml, manteniéndose 12 h a 37°C. De nuevo se centrifugó 5 min a 4000 rpm y el sedimento se resuspendió en 500 µl de tampón PBS. Las células se sonicaron a máxima potencia durante 10 s comprobándose al microscopio óptico (40x) que no había células agregadas. Se añadieron 5 µl de yoduro de propidio 50 µg/ml incubándose a 37°C durante 20 minutos en oscuridad. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo EPICS® XL-MCL (Beckman Coulter) con un voltaje de 1039 V y una

ganancia de 20 utilizando uno de los detectores de fluorescencia del aparato (FL3, 620 nm). El análisis se hizo en formato lineal (FL3LIN).

5 ANÁLISIS DE LA ESPORULACIÓN

Las células obtenidas a partir de preinóculos crecidos en medio YPD líquido, tras lavarse 2 veces con agua destilada, se sembraron en placas de 5% Malt Extract, YM, Acetato, Gorodkwa y patata dextrosa agar. Se analizó la capacidad de esporulación después de 2-3 días, 1 semana, y a intervalos de 2-3 semanas de crecimiento. Se emplearon tanto muestras en fresco como muestras teñidas con verde malaquita-safranina. El procedimiento seguido para la tinción de esporas fue el siguiente: la preparación se fijó en un porta por calor, se adicionó una solución de verde malaquita al 5% mientras se calentaba el porta con la llama del mechero Bunsen a intervalos de 30 segundos durante 5-7 minutos evitando que se secase. Posteriormente, previo lavado con agua, se añadió safranina al 0.5%, se dejó actuar 20 segundos, se volvió a lavar con agua y se dejó secar completamente. Tanto las muestras en fresco como las teñidas se analizaron por microscopía óptica de campo claro con un objetivo 100X.

6 EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN *E. coli*

Los transformantes de *E. coli* (Rosetta 2) donde se incorporaron las construcciones de interés, se crecieron en medio de cultivo 2XTY a 37°C con ampicilina (200 µg/ml) y cloramfenicol (68 µg/ml) hasta una DO₆₀₀ de 0.6. Se indujo la expresión de la proteína heteróloga con IPTG (5 mM) durante 14 h a 12°C. Se recogieron las células mediante centrifugación a 6000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se concentraron 100 veces resuspendiéndolas en tampón de lisis (imidazol 10 mM, NaCl 500 mM y tampón fosfato 20 mM, pH 7.4) con lisozima (1 mg/ml) e inhibidor de proteasas Complete EDTA-free (ROCHE). Esta suspensión se incubó 30 min en hielo y las células se rompieron por sonicación en un LABSONIC de B.BRAUN-BIOTECH con 5 ciclos de pulsos de 30 s a 200 W con una frecuencia de 0.5 cada segundo, seguido de 30 s de reposo, manteniendo la muestra en hielo en todo momento. Tras ello, se centrifugó 1 hora a 10000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante que se almacenó a 4°C hasta su análisis posterior.

7 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Los ensayos cromatográficos se llevaron a cabo utilizando diferentes columnas, según la aplicación, acopladas a un equipo ÁKTA-Purifier (GE-Healthcare).

7.1 Purificación de proteínas

Para la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad se utilizó la columna HisTrap FF Crude 1 ml (GE-Healthcare). Las condiciones del método utilizadas fueron las detalladas en la Figura 22 con un flujo de 1 ml/min. Una vez realizada la cromatografía, se seleccionaron las fracciones de interés, se dializaron (1/10000) con buffer fosfato 20 mM, NaCl 50 mM pH 7.5 y se almacenaron a -20°C.

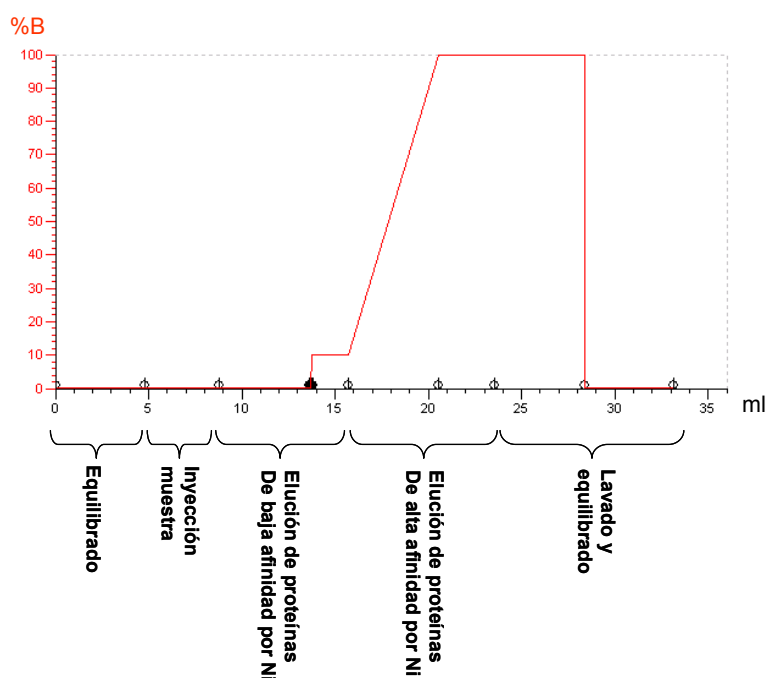


Figura 22. Método utilizado para la purificación de proteínas en el equipo AKTA-purifier. Los tampones utilizados fueron: A (imidazol 10 mM, NaCl 500 mM y tampón fosfato 20 mM, pH 7.4). B (imidazol 500 mM, NaCl 500 mM y tampón fosfato 20 mM, pH 7.4). Se señala solamente el %B en cada etapa (el %A es 100-%B).

7.2 Cromatografía de exclusión molecular

Una muestra (150 μ l) de invertasa purificada (9 mg/ml) se inyectó en una columna Superdex 200 HR 10/30 (GE-Healthcare) y se eluyó con 2 volúmenes de columna de tampón (fosfato 50 mM, NaCl 0.15 M pH 7) a un flujo de 0.25 ml/min. Los patrones fueron suministrados por Bio-Rad (cat # 151-1901) y se resolvieron en las mismas condiciones.

8 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA INVERTASA

8.1 Ensayo de liberación de glucosa

La reacción se llevó a cabo en un volumen de 100 μ l con 90 μ l de sacarosa 66.7% en tampón acetato pH 4.8 y 10 μ l de enzima o extracto enzimático. Se incubó durante 10-60 minutos a 37 ó 50°C según los casos, y posteriormente se inactivó la enzima hirviendo la muestra a 100°C durante 10 minutos. La glucosa liberada se determinó mediante un kit comercial de Sigma Diagnostics (Sigma 510-A), que suministra glucosa-oxidasa, peroxidada y o-dianisidina. La glucosa liberada tras la incubación de la enzima con sacarosa se transforma en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno por medio de la enzima glucosa-oxidasa. La o-dianisidina en presencia de peróxido de hidrógeno es transformada por una peroxidada en o-dianisidina oxidada que tiene un color marrón detectable a 450 nm en un espectrofotómetro. Se realizó una recta patrón utilizando diferentes cantidades conocidas de glucosa, lo que permitió relacionar la absorbancia a 450 nm con la concentración de glucosa. El producto de la reacción de la invertasa se diluyó de forma apropiada para que la cantidad de glucosa liberada entrara en los márgenes de linealidad de la recta patrón hasta un volumen final de 100 μ l. A continuación, se añadió 1 ml de reactivo enzima-sustrato comercial (preparado de acuerdo a las recomendaciones del fabricante) y se incubó 30 minutos a 37°C antes de medir la absorbancia a 450 nm. Se define 1 unidad de actividad como 1 μ mol de glucosa liberada por minuto. Ya que la liberación de glucosa es concomitante tanto a la reacción de hidrólisis como a la de transfructosilación (Figura 23) este ensayo se utilizó para evaluar la “actividad global” de la enzima.

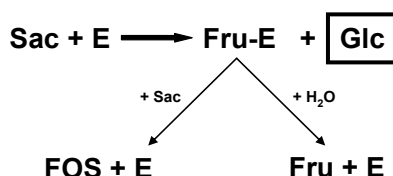


Figura 23. Esquema representativo de las reacciones de hidrólisis y transfructosilación catalizadas por invertasas de la familia GH32. Sac: sacarosa; E: enzima; Fru-E: complejo enzima-fructosa; Fru: fructosa; Glc: glucosa.

8.2 Determinación de actividad transfructosilante

La actividad enzimática transfructosilante se analizó mediante cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico combinado con un detector amperométrico pulsado (DIONEX HPAEC-PAD).

La reacción se llevó a cabo añadiendo 0.15-0.6 U/ml de enzima a una disolución de sacarosa (60-77% de concentración final a pH 4.8). Para comparar la capacidad transfructosilante de distintas enzimas se emplearon las mismas unidades enzimáticas determinadas como glucosa liberada por unidad de tiempo. Se incubó la mezcla de reacción según los ensayos a 37, 40, 50 ó 60°C, durante distintos tiempos, se inactivó la enzima calentando a 100°C durante 10 minutos y se almacenaron los productos de reacción a -20°C hasta el momento de su análisis. Esta muestra se diluyó 1/10 en agua, se filtró y se diluyó de nuevo de forma apropiada para que la cantidad de azúcares entrara en el rango de linealidad de las rectas patrón correspondientes, antes de inyectarla en una columna PA-100 acoplada a un equipo Dionex. El programa que se utilizó (Tabla 13) consta de tres etapas: la primera es un lavado de 5 minutos (desde el minuto -35 al -30.1), seguido de un equilibrado de la columna durante 30 minutos (desde el -30.0 al 0.0) y finalmente, tras la inyección de la muestra, se lleva a cabo la separación cromatográfica (del 0.0 al 12.6).

Para la identificación y cuantificación de los compuestos formados tras la reacción de transfructosilación, se utilizaron patrones de concentración conocida de glucosa, fructosa, sacarosa, 1-kestosa y nistosa (Sigma). La 6-kestosa fue suministrada por el Dr. Francisco Plou (Instituto de Catálisis y Petroleoquímica CSIC, Madrid).

Tabla 13. Programa utilizado para la separación cromatográfica de mono, di y oligosacáridos en el DIONEX HPAEC-PAD. Las soluciones utilizadas fueron: (A) agua; (B) 1 M NaOH; (C) 1 M NaOAc y (D) agua. El tiempo 0 corresponde al momento de la inyección de la muestra y los tiempos negativos a las etapas de lavado y equilibrado de la columna. Los cambios de concentración entre los tiempos indicados se realizaron de forma lineal.

Tiempo (min)	%A	%B	%C	%D
-35.0	25	30	20	25
-30.1	10	30	50	10
-30.0	45	10	0	45
0.0	45	10	0	45
2.0	45	10	0	45
5.0	35	30	0	35
12.5	27.5	30	15	27.5
12.6	45	10	0	45

9 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS E INMUNODETECCIÓN

9.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.

Las muestras a analizar por electroforesis de proteínas se prepararon a partir de una alícuota del extracto (20 µl) a la que se le añadió 20 µl de tampón de carga de proteínas 2x (Tris-HCl 0.125 M, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.05% y β-mercaptoetanol al 0.1%) incubándose 5 min a 100°C. Estas muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (1 h a 100 V) según lo indicado por Sambrook et al. (1989) en un aparato omniPAGE Mini de Cleaver Scientific.

Una vez terminada la electroforesis, los geles se incubaron con un tampón de tinción (Coomassie brilliant blue R250 0.25%, metanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)) en agitación durante 20 min, y posteriormente con una solución de destinción (Metanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)).

9.2 Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa e inmunodetección.

Para los análisis “western blot”, las proteínas se separaron por electroforesis y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (1 h, 100 V) con el sistema comercial de transferencia Mini Trans-Blot^R (BioRad) en tampón TB (25 mM Tris, 150 mM glicina y 20% metanol, pH 8.3).

Después de un tratamiento de bloqueo con BSA al 3% en TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5), durante 30 minutos a temperatura ambiente, las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-His de conejo (His probe H-15 Santa Cruz Biotech) diluido 1:200 en TBS/3% BSA, durante toda la noche a 4°C. Tras varios lavados de 10 min con TBS-T (0.1% Tween 20 en TBS) se realizó la incubación con el anticuerpo secundario, inmunoglobulina G anti-conejo conjugada con peroxidasa (anti Rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotech), diluido 1:5000 en TBS/2.5% leche en polvo, durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras los lavados con TBS-T la membrana se reveló con un sustrato quimioluminiscente (Pierce ECL western blotting substrate, Thermo Scientific) y la señal se detectó con una cámara CCD (FUJIFILM LAS-1000 plus).

10 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS

10.1 Modelización estructural

Con el fin de identificar la estructura tridimensional resuelta con mayor homología a la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae* se utilizó el servidor I-TASSER (Roy et al. 2010, Zhang 2008, Zhang 2009). El homólogo estructural de mayor similitud fue la invertasa de *Schwanniomyces occidentalis* (3KF5). En base a este alineamiento se generó un proyecto de modelización mediante el programa gráfico Swiss-PDB Viewer (Guex y Peitsch 1997) que a su vez se utilizó para la modelización estructural con el programa SWISS-MODEL en modo proyecto (Arnold et al. 2006, Guex y Peitsch 1997, Kopp y Schwede 2004, Peitsch 1995, Schwede et al. 2003). Las estructuras proteicas modelizadas fueron analizadas con el programa Pymol (Delano Scientific LLC 2006). Para superponer varias estructuras de proteínas se utilizó el programa Dalilite (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/dalilite/index.html>). El

análisis de acoplamiento “docking” entre la 6-kestosa y el modelo de Suc2 se llevó a cabo con el programa Autodock (<http://autodock.scripps.edu/references>). Las coordenadas de la 6-kestosa se obtuvieron de la estructura cristalina depositada en la “Cambridge Structural Database” (CSD Refcode CELGIJ). Utilizando el programa AutoDockTools se añadieron al ligando todos los átomos de hidrógeno y se le asignaron las cargas por el método Gasteiger. Todos los puentes de grupos hidroxilos y los enlaces glicosídicos fueron definidos como enlaces rotatorios, pero no los de los anillos del azúcar. El modelo inicial contiene las coordenadas de la Suc2 modelada pero fue necesario realizar algunos ajustes manuales de las cadenas laterales del Trp 48, Glu 203 and Tyr 267 para permitir la entrada del ligando al centro activo. Los átomos de hidrógeno polares se añadieron utilizando el programa AutoDockTools. Autodock 4.0 se ejecutó 50 veces con el algoritmo genético Lamarckiano (LGA), una población de 150, ratio de mutación 0.02 y ratio de cruce 0.8. Las simulaciones se desarrollaron con un máximo de 2500000 evaluaciones de energía y un máximo de 27000 generaciones. Los resultados del docking se agruparon utilizando un valor de corte de 2 Å RMSD. La mínima energía total del docking de -11.1 kcal/mol se obtuvo para una posición que pertenece al grupo mejor valorado, el cual contiene 23 de las 50 soluciones y tiene una energía media de docking de -9.1 kcal/mol.

10.2 Cristalización de proteínas

La cristalización de proteínas se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra. Julia Sanz Aparicio (Instituto de Química-Física Rocasolano CSIC, Madrid), siguiendo los procedimientos que se detallan en Polo et al. (2009).

RESULTADOS

1 CARACTERIZACIÓN DE *Wickerhamomyces onychis* Y *Wickerhamomyces navarrensis* sp. nov.

1.1 Rastreo e identificación de microorganismos productores de invertasas e inulinasas.

Con el fin de encontrar microorganismos productores de invertasas, inulinasas y transferasas susceptibles de ser empleadas en la biosíntesis de fructooligosacáridos (FOS), procedimos a la búsqueda de levaduras presentes en muestras de tierra asociada a raíces de cebolla y ajo. Se sabe que estas hortalizas son ricas en sacarosa y fructanos (Demeulle et al. 1981, Franck y de Leenheer 2005) por lo que es de esperar que los microorganismos asociados a estas plantas produzcan enzimas con las actividades buscadas. Las muestras objeto de estudio se tomaron el 3 de Marzo de 2008 y procedían de un huerto situado en el término municipal de Ribaforada (Navarra).

A partir de las muestras de tierra se aislaron seis clones de levadura con diferente morfología colonial. Se purificó DNA de cada uno de ellos, se amplificó mediante PCR la región correspondiente al DNA ribosómico 5.8S y se secuenciaron los fragmentos de DNA amplificados para proceder a la caracterización filogenética de las distintas levaduras (Tabla 14). Tres de las secuencias se identificaron como *Trichosporon mucoides* (clones A, B, C) y una como *Candida tropicalis* (clon E). Las secuencias de los dos clones restantes (D y F) mostraron elevado grado de similitud con una secuencia presente en la base de datos, correspondiente a un ascomiceto no cultivado. Las secuencias D y F eran idénticas entre sí y por tanto correspondían a una misma especie que denominamos inicialmente levadura D (Tabla 14).

Respecto a las otras muestras, el género *Trichosporon* incluye aproximadamente 30 especies, de las cuales al menos 6, incluida *Trichosporon mucoides* causan infecciones (trichosporonosis), tanto internas como superficiales. Por otro lado, la levadura *Candida tropicalis* es patógena, considerándose la segunda especie más patogénica del género *Candida* después de *Candida albicans*. Aunque puede estar presente en mucosas consideradas sanas, se asocia más habitualmente a infecciones fúngicas internas. Estos antecedentes nos llevaron a desechar los aislados de *Trichosporon mucoides* y *Candida tropicalis* como candidatos para una

aplicación alimentaria como es la producción de FOS. Nos propusimos estudiar en profundidad la levadura D para poder determinar si se trataba de una nueva especie no identificada.

Tabla 14. Identidad de secuencias del rDNA 5.8S de levaduras aisladas a partir de tierra asociada a raíces de ajo y cebolla.

Levadura	Acceso	Descripción	Puntuación total	Cobertura	Identidad Máxima
A	FJ515196.1	<i>T. mucoides</i> SN19	848	70%	98%
B	AF455482.1	<i>T. mucoides</i> wb305	841	69%	97%
C	AF455482.1	<i>T. mucoides</i> wb305	865	68%	99%
D	AM901934.1	Ascomiceto sin cultivar	1026	78%	98%
E	FJ662410.1	<i>C. tropicalis</i> ZA038	729	58%	97%
F	AM901934.1	Ascomiceto sin cultivar	1029	82%	98%

1.2 Caracterización filogenética.

DNA ribosómico

La clasificación filogenética de levaduras se ve enormemente facilitada por la disponibilidad de una amplia base de datos de secuencias de la región D1/D2 del rRNA 26S (Fell et al. 2000, Kurtzman y Robnett 1997, Kurtzman y Robnett 1998). Por ello se clonó y secuenció esta región de la levadura D. Por medio de análisis BLAST comprobamos que la secuencia estudiada mostraba un grado de identidad de 98.9% con la correspondiente a una levadura poco estudiada, denominada *Pichia onychis*, en la actualidad *Wickerhamomyces onychis* (Kurtzman et al. 2008) (Tabla 15).

De acuerdo con lo establecido por estudios previos se suelen considerar especies distintas aquellas que presentan más de un 1% de divergencia en esta secuencia. Mediante el análisis de la región D1/D2 de más de 500 especies de ascomicetos se descubrió que las cepas de la

misma especie muestran normalmente hasta 3 sustituciones mientras que las cepas de distintas especies frecuentemente presentan más de 6 sustituciones (Kurtzman y Robnett 1997, Kurtzman y Robnett 1998, Lu et al. 2004b, Lu et al. 2004a, Suh y Blackwell 2004). Cuando se compararon las secuencias nucleotídicas de la región D1/D2 del gen 26S del rDNA de la levadura D y *W. onychis*, el número de sustituciones fue de 7 (Tabla 15).

Tabla 15. Divergencias a nivel nucleotídico en la región D1/D2 del gen 26S del rDNA. El porcentaje de identidad se ha calculado solamente a partir del número de nucleótidos diferentes, es decir, no se han cuantificado las inserciones/delecciones.

	Tamaño	Nº nt. diferentes	% identidad	Nº inserc/ delecciones
<i>W. onychis</i>	643	7	98.91	3
Levadura D	640			

Las divergencias de secuencia encontradas entre la levadura D y su pariente más próximo, *W. onychis*, indican que esta cepa representa una nueva especie que hemos denominado *W. navarrensis* en alusión a la región de donde se aisló. A partir de secuencias obtenidas en el GenBank de la región D1/D2 de especies filogenéticamente cercanas a *W. navarrensis* y *W. onychis*, se elaboró un árbol con el fin de determinar la situación de la nueva levadura (Figura 24).

En consecuencia, decidimos realizar un estudio comparativo en profundidad de *W. navarrensis* y una muestra de *W. onychis* obtenida a partir de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Nos planteamos determinar con precisión la relación filogenética entre ambas levaduras así como profundizar en la caracterización bioquímica y molecular de *W. onychis*.

A partir de la amplificación por PCR y secuenciación de la región 5.8S-26S del DNA ribosómico se obtuvieron las secuencias del rDNA de *W. navarrensis* y *W. onychis* que se depositaron en la base de datos GenBank (Tabla 16). Comparando las secuencias ITS obtenidas de ambas levaduras se observó que había una diferencia considerable tanto en la ITS1 como en la ITS2. En la región ITS1 la identidad es del 96.18%, mientras que en la ITS2 es del 98.05%. En total, alineando la zona del DNA ribosomal ITS1-5.8S-ITS2, las levaduras presentan una identidad del 97.24% (Tabla 17).

Utilizando secuencias de la zona ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA disponibles en el GenBank de diferentes levaduras próximas a *W. navarrensis* y a *W. onychis*, se procedió a su alineamiento, a partir del cual se elaboró un árbol filogenético (Figura 25).

Comparando las secuencias completas que se obtuvieron de la región comprendida entre el gen 18S y el 26S del DNA ribosomal de *W. navarrensis* y *W. onychis*, se observó una identidad del 98.04%.

Tabla 16. Códigos de acceso y descripción en la base de datos GenBank del rDNA de *W. navarrensis* y *W. onychis*.

Acceso		Descripción
<i>W. navarrensis</i>	EU877913.1	<i>Pichia sp.</i> JP-2008 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
<i>W. onychis</i>	EU877914.1	<i>Pichia onychis</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Tabla 17. Divergencias a nivel nucleotídico en la región ITS1, ITS2 e ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA. El porcentaje de identidad se ha calculado solamente a partir del número de nucleótidos diferentes, es decir, no se han cuantificado las inserciones/delecciones.

Región		Tamaño	Nº nt diferentes	% identidad	Nº inserc/delecciones
ITS1	<i>W. onychis</i>	262	10	96.18	9
	<i>W. navarrensis</i>	263			
ITS2	<i>W. onychis</i>	412	8	98.05	16
	<i>W. navarrensis</i>	398			
ITS1-5.8S-ITS2	<i>W. onychis</i>	654	18	97.24	25
	<i>W. navarrensis</i>	641			

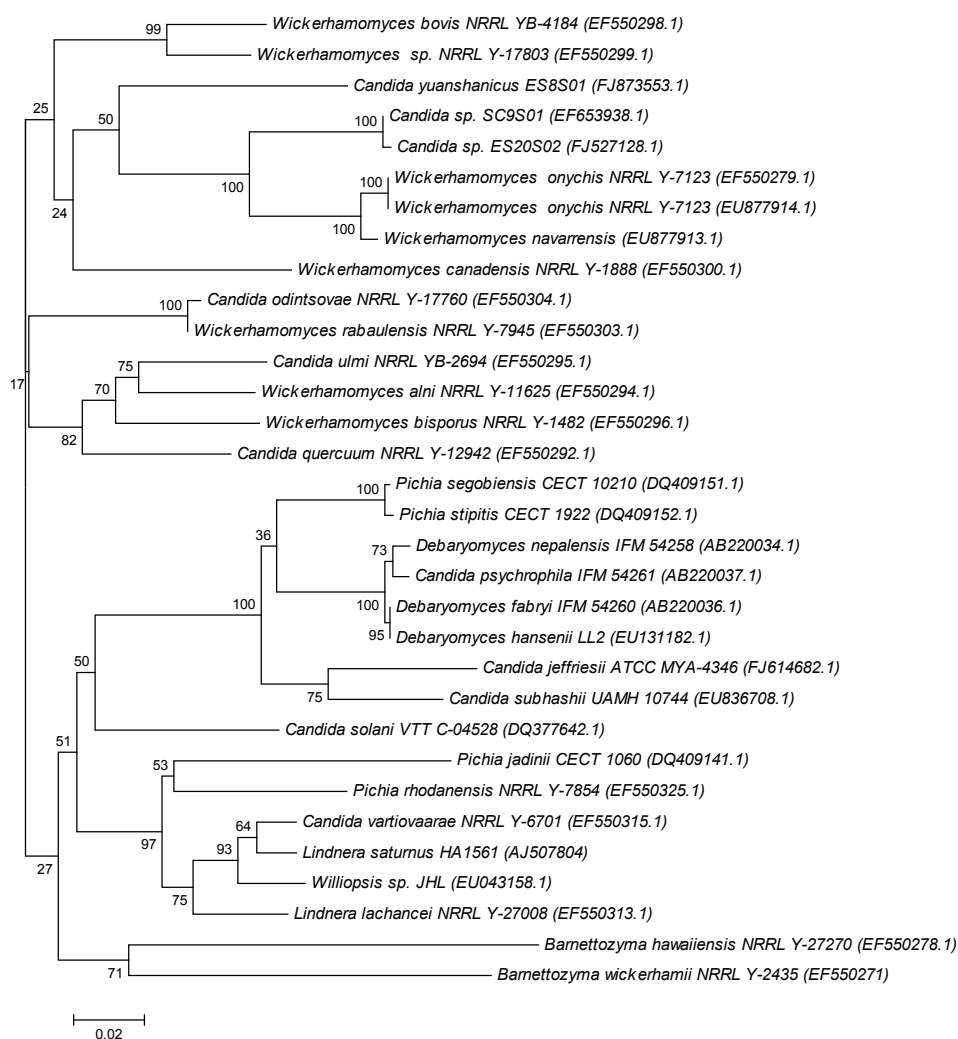


Figura 24. Árbol filogenético de diferentes géneros y especies de levaduras incluyendo a *W. navarrens* y *W. onychis* en base a su rDNA D1/D2. Las secuencias utilizadas fueron las obtenidas a partir de la amplificación de la región D1/D2 del gen 26S usando como cebadores NL-1 y NL-4. El árbol se construyó con el método “BIONJ neighbour-joining” y “Kimura’s two-parameter” como modelo. Las cifras en los nodos representan los porcentajes de “bootstrap” de 1000 réplicas. La barra de escala representa 0.02 sustituciones por posición de base.

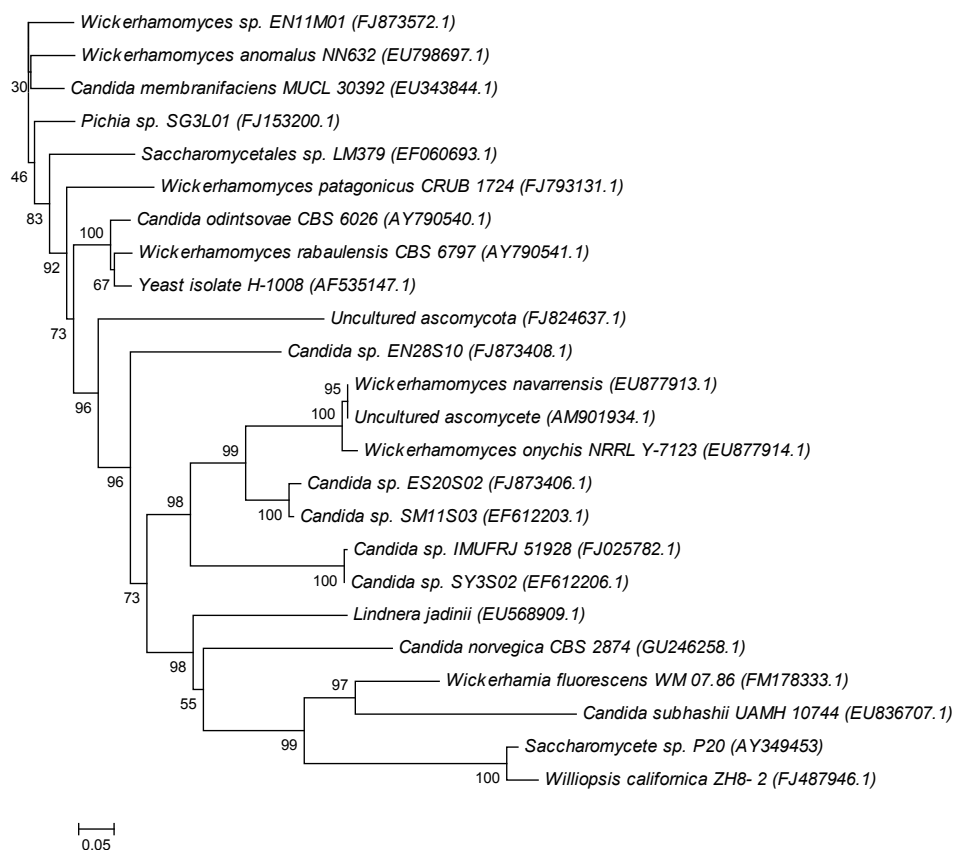


Figura 25. Árbol filogenético de diferentes géneros y especies de levaduras incluyendo a *W. navarrensis* y *W. onychis* en base a su rDNA ITS1-5.8S-ITS2. Las secuencias utilizadas fueron las obtenidas a partir de la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 usando como cebadores ITS1-ITS4. El árbol se construyó con el método “BIONJ neighbour-joining” y “Kimura’s two-parameter” como modelo. Las cifras en los nodos representan los porcentajes de “bootstrap” de 1000 réplicas. La barra de escala representa 0.05 sustituciones por posición de base.

URA3

El gen *URA3* codifica la enzima orotidina-5'-fosfato decarboxilasa (OMPD). La secuencia aminoacídica de esta enzima se ha utilizado en estudios filogenéticos para comparar especies evolutivamente alejadas (Radford 1993).

Para poder amplificar el gen *URA3* se diseñaron cebadores degenerados a partir de alineamientos de secuencias de este gen pertenecientes a diferentes levaduras. Esto permitió amplificar la zona central del gen de las levaduras estudiadas, y secuenciarla. Para obtener la secuencia completa del gen, se empleó una nueva variante de la técnica denominada Genome Walking. Esta aproximación se basa en reacciones sucesivas de PCR utilizando cebadores específicos de la zona conocida del gen junto con otros universales que pueden hibridar en zonas aleatorias del DNA genómico del organismo estudiado (Guo y Xiong 2006). Las secuencias nucleotídicas completas de los alelos del gen *URA3* de *W. navarrensis* y *W. onychis* se depositaron en el GenBank (Tabla 18) y mostraron un 98.1% de identidad, que se tradujo en un 97.7% de identidad a nivel de aminoácidos (Tabla 19).

Tabla 18. Número de acceso en el GenBank de los genes *URA3* de *W. navarrensis* y *W. onychis*.

Acceso		Descripción
<i>W. navarrensis</i>	HM219009	<i>W. navarrensis</i> sp. nov. orotidine-5'-phosphate decarboxylase (Ura3) gene, complete cds.
<i>W. onychis</i>	HM219008	<i>W. onychis</i> CECT 1458 orotidine-5'-phosphate decarboxylase (Ura3) gene, complete cds.

Tabla 19. Diferencias a nivel nucleotídico y aminoacídico del *URA3* entre *W. navarrensis* y *W. onychis*.

	Tamaño	Diferencias	% identidad
Nucleótidos	804	15	98.1
Aminoácidos	268	6	97.7

El árbol filogenético se realizó recopilando secuencias de genes *URA3* de diversos géneros y especies de levaduras que se alinearon junto con los de *W. navarrensis* y *W. onychis* (Figura 26).

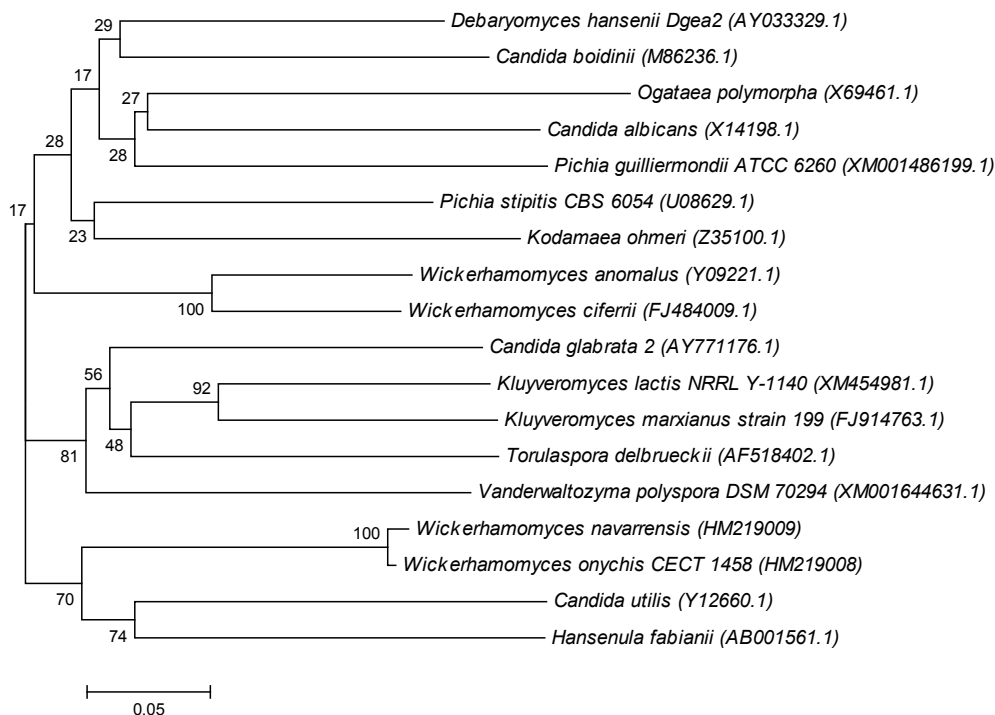


Figura 26. Árbol filogenético de diferentes géneros y especies de levaduras incluyendo a *W. navarrensis* y *W. onychis* en base a su gen *URA3*. Las secuencias utilizadas fueron las obtenidas por PCR usando como cebadores AL650 y AL651 construido con el método “BIONJ neighbour-joining” y “Kimura’s two-parameter” como modelo. Las cifras en los nodos representan los porcentajes de “bootstrap” de 1000 réplicas. La barra de escala representa 0.05 sustituciones por posición de base.

1.3 Estudio cromosómico y contenido de DNA

Para separar los cromosomas de las levaduras empleamos electroforesis en gel de campo pulsante (*pulsed field gel electrophoresis*, PFGE). Esta técnica es un instrumento importante para el análisis cromosómico de hongos y levaduras. Utilizamos una variante de PFGE, el CHEF (*contour-clamped homogeneous electric field*) para estudiar

comparativamente los patrones cromosómicos de *W. navarrensis* y *W. onychis*. *W. navarrensis* mostró un cariotipo bien definido, apreciándose 5 bandas correspondientes a 5 cromosomas (Figura 27, líneas 5 y 6). Por el contrario, *W. onychis* presentó una dotación cromosómica más variable, observándose hasta tres patrones cromosómicos diferentes en distintas cepas (Figura 27, líneas 1-4).

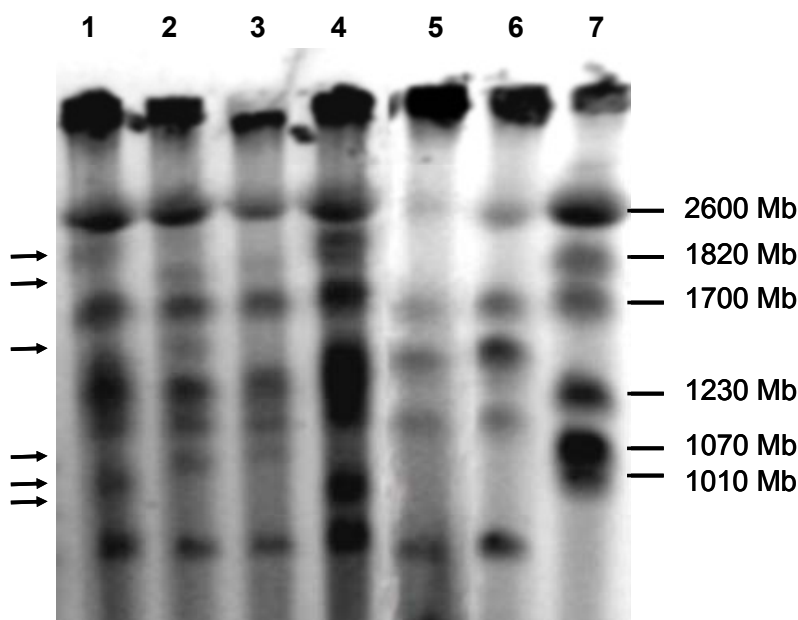


Figura 27. Cariotipo analizado mediante CHEF de varios clones de *W. onychis* (líneas 1-4) y *W. navarrensis* (líneas 5 y 6). El cariotipo de *Candida albicans* (línea 7) se muestra como control. Las bandas diferenciales entre *W. onychis* y *W. navarrensis* se indican por flechas.

Se determinó la dotación cromosómica de *W. navarrensis* y *W. onychis* mediante citometría de flujo. El ensayo para cada una de las levaduras estudiadas se realizó por triplicado obteniéndose valores muy semejantes. Los resultados indicaron que *W. navarrensis* y *W. onychis* tienen aproximadamente el mismo contenido de DNA por célula y por tanto, la

misma ploidía. El valor obtenido fue de alrededor de 1.5, en comparación con las cepas haploides de *S. cerevisiae*, usadas como referencia (Figura 28).

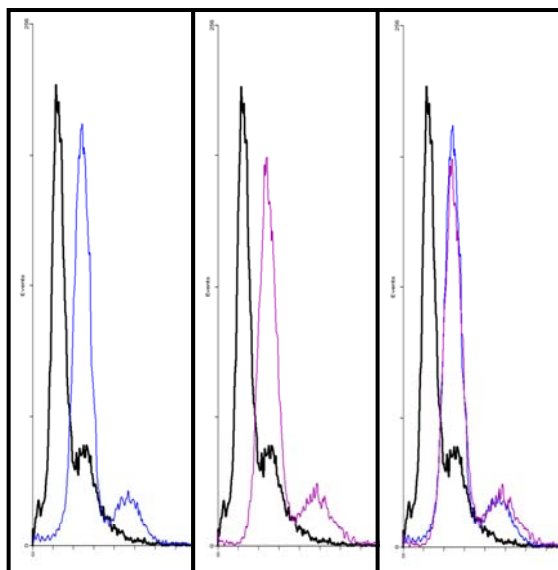


Figura 28. Análisis de ploidía de *W. navarrensis* y *W. onychis* mediante citometría de flujo. Control: cepa haploide de *S. cerevisiae* (pico negro), *W. navarrensis* (pico azul) y *W. onychis* (pico morado). Se marcaron con el fluoróforo yoduro de propidio cultivos de *W. navarrensis* y *W. onychis* (por triplicado) y se inyectaron en un citómetro de flujo normalizando previamente el número de células. Se representan las frecuencias (en ordenadas) de las intensidades del fluoróforo (en abscisas), medidas para cada célula en los diferentes cultivos.

1.4 Caracterización morfológica y citológica

Con el objeto de encontrar posibles diferencias en el aspecto colonial se cultivaron *W. navarrensis* y *W. onychis* en placas Petri con diferentes medios de cultivo utilizados habitualmente para hongos y levaduras. No se observaron diferencias significativas entre ambas en medio YPD. Sin embargo, en medio SPIDER, utilizado para inducir la esporulación de hongos, las colonias de *W. navarrensis* fueron mucho más pequeñas, casi

inapreciables a simple vista, mientras que las de *W. onychis* mostraron un buen crecimiento (Figura 29).

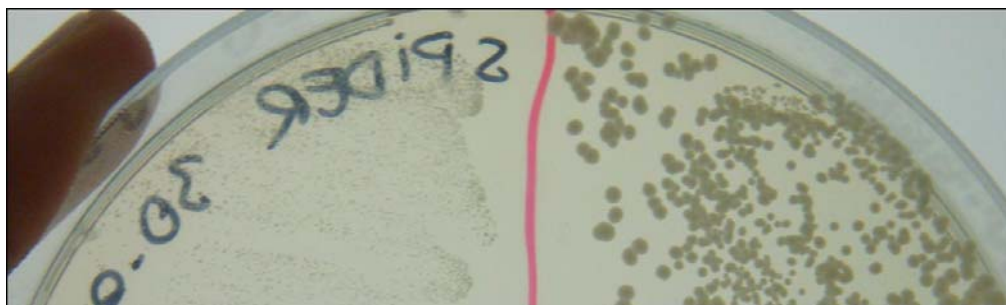


Figura 29. Crecimiento colonial de *W. navarrensis* (izquierda) y *W. onychis* (derecha) en medio SPIDER durante 72 h a 30°C.

En placas de medio completo con celobiosa como fuente de carbono (YPCel) se observaron diferencias en la coloración de las colonias, que iba haciéndose más manifiesta a medida que las colonias adquirían mayor tamaño. Las colonias de *W. navarrensis* eran blanquecinas, de color homogéneo mientras que las de *W. onychis* tenían un tono parduzco, oscuro en el centro y más claro por los bordes (Figura 30).

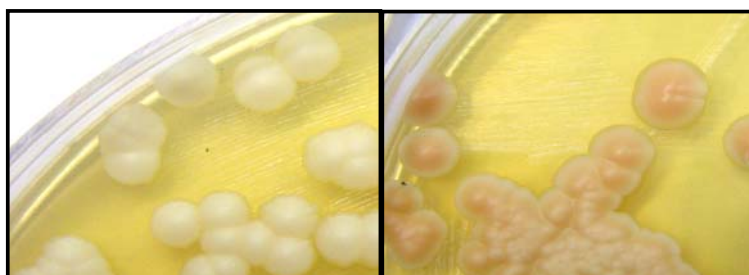


Figura 30. Aspecto colonial de *W. navarrensis* (izquierda) y *W. onychis* (derecha) crecidas en medio completo con celobiosa como fuente de carbono (YPCel) durante 72 h a 30°C.

En un examen de ambos cultivos al microscopio óptico, las células de *W. navarrensis* presentaron un aspecto homogéneo, con morfología redondeada mientras que las células de *W. onychis* fueron más heterogéneas, observándose células redondeadas y alargadas (Figura 31).

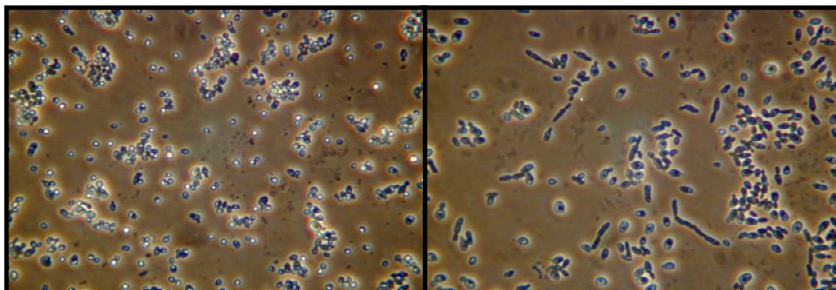


Figura 31. Morfología y tamaño celular observable al microscopio óptico (40x), de *W. navarrensis* y *W. onychis* cultivadas en medio completo con celobiosa como fuente de carbono (YPcel) durante 72 h a 30°C.

La morfología celular de *W. navarrensis* se estudió en detalle mediante microscopía electrónica (Figura 32). Las células de *W. navarrensis* presentaron forma ovalada y mostraron reproducción asexual por gemación multipolar. El tamaño celular fue de 2.1-2.7 x 3.3-3.9 μm .

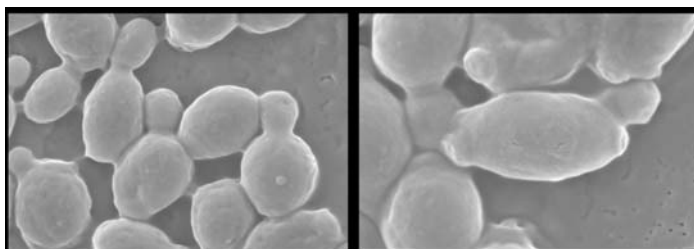


Figura 32. Aspecto de *W. navarrensis* al microscopio electrónico a partir de un cultivo crecido en YPD durante 12 h a 30°C.

1.5 Análisis de la capacidad de esporulación

Estudiamos la capacidad de esporulación de la nueva levadura con el fin de determinar su estado sexual ya que si esta cepa forma esporas se debería clasificar dentro del género *Wickerhamomyces* (al igual que *W. onychis*), mientras que si no lo hace tendría que catalogarse dentro del género *Candida*. También se incorporó *W. onychis* al ensayo como control. En la bibliografía se ha descrito que esta especie forma esporas tipo “sombbrero”.

El análisis de la esporulación se realizó creciendo las cepas en medios de cultivo específicos. Se seleccionaron 5 medios que se utilizan habitualmente para este fin, como son el 5% Malt Extract, YM, Acetato, Gorodkwa y patata dextrosa agar. Se ha descrito en la bibliografía que *W. onychis* esporula en 5% Malt Extract e YM, hecho que se corrobora en nuestros ensayos que indican además que en el primero de ellos la levadura esporula mucho mejor (Figura 33). Del mismo modo, *W. navarrensis* también esporula en ambos medios, pero en menor grado que *W. onychis* (Figura 34).

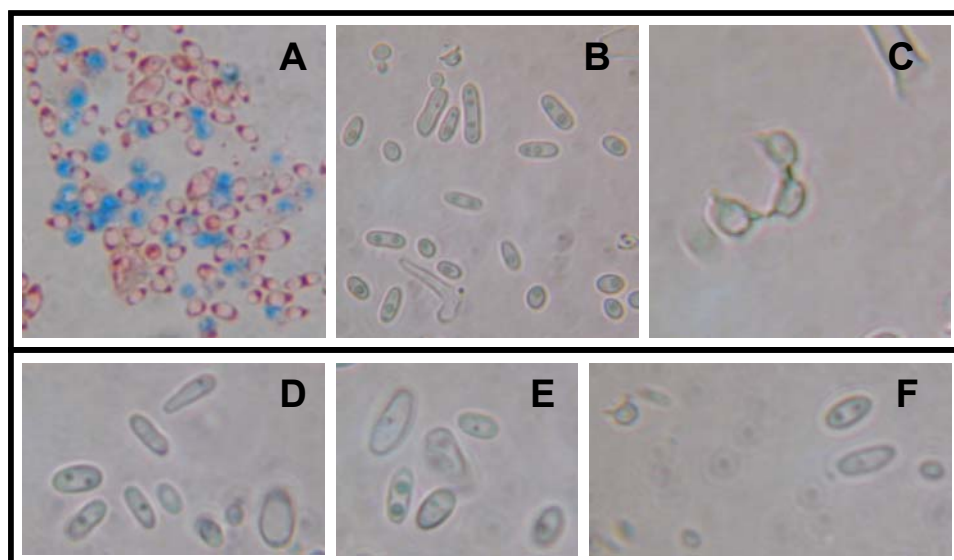


Figura 33. Imágenes de células esporuladas de *W. onychis* tomadas por microscopía óptica en campo claro con objetivo 100X. La levadura se creció 4-6 semanas a 20°C en 5% Malt Extract (A, B, C) o YM (D, E, F). La muestra en A se tiñó previamente con verde malaquita.

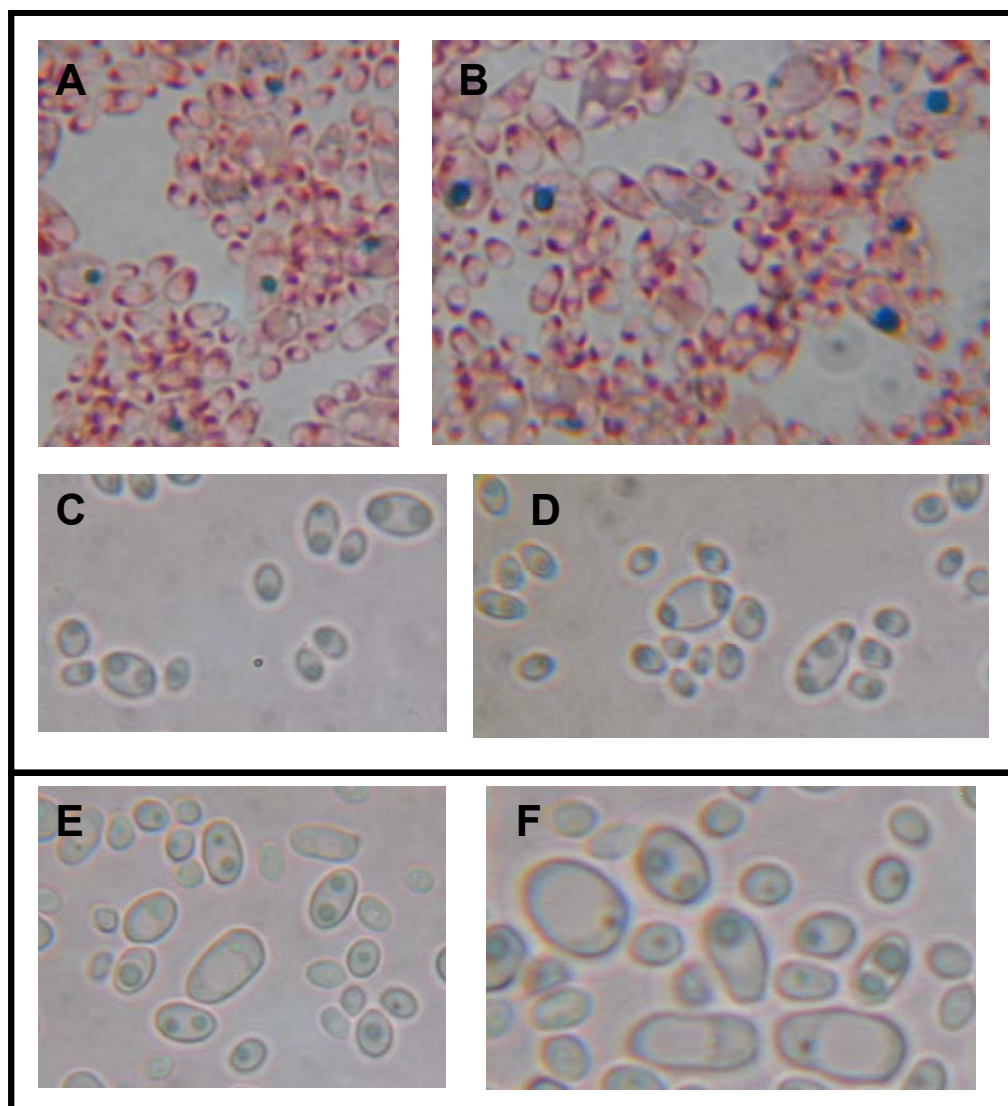


Figura 34. Imágenes de células esporuladas de *W. navarrensis* tomadas por microscopía óptica en campo claro con objetivo 100X. La levadura se creció 4-6 semanas a 20°C en 5% Malt Extract (A, B, C, D) o YM (E, F). La muestra en A y B se tiñó previamente con verde malaquita.

1.6 Caracterización bioquímica

Estudiamos las propiedades bioquímicas y metabólicas de las dos levaduras y se observó, ensayando la actividad de distintas enzimas, que ambas levaduras tenían características muy similares, a excepción de la actividad α -glucosidasa que sólo se detectó en *W. onychis* (Tabla 20).

Tabla 20. Ensayos de actividad enzimática de *W. navarrensensis* y *W. onychis*, utilizados habitualmente para la identificación de levaduras en análisis clínicos.

Enzimas	<i>W. navarrensensis</i>	<i>W. onychis</i>
L-LISINA-ARILAMIDASA	-	-
LEUCINA ARILAMIDASA	+	+
ARGININA GP	-	-
TIROSINA ARILAMIDASA	+	+
β -N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASA	-	-
GAMMA-GLUTAMIL-TRANSFERASA	-	-
PNP-N-ACETIL- β D- GALACTOSAMINIDASA 1	-	-
UREASA	-	-
α -GLUCOSIDASA	-	+
ESCULINASA	+	+

Las dos levaduras mostraron diferencias en su capacidad para asimilar diferentes sustratos (Tabla 21). Sólo *W. onychis* fue capaz de utilizar L-malato, D-sorbitol y D-trehalosa mientras que sólo *W. navarrensensis* dio resultado positivo en la asimilación de citrato. Ambas levaduras asimilaron sacarosa, pero no inulina, de modo que cabía esperar que ambas poseyeran

invertasas, con posible actividad transfructosilante que pudieran ser útiles para la biosíntesis de FOS.

Tabla 21. Asimilación de diferentes sustratos por *W. navarrensis* y *W. onychis*.

Asimilación	<i>W. navarrensis</i>	<i>W. onychis</i>
L-MALATO	-	+
GLICEROL	+	+
D-GALACTOSA	-	-
D-GLUCOSA	+	+
LACTOSA	-	-
D-CELOBIOSA	+	+
D-MALTOSA	+	+
D-RAFINOSA	+	+
D-SORBITOL	-	+
SACAROSA	+	+
ARBUTINA	+	+
D-TREHALOSA	-	+
ACETATO	+	+
INULINA	-	-
CITRATO (SODIO)	+	-
AMIGDALINA	-	-
TURANOSA	+	+
GENTIOBIOSA	+	+
D-MELOCITOSA	+	+
XILOSA	+	+
NITRATO	-	-

Para completar la información sobre diferencias de crecimiento observadas en placas de medio sólido con celobiosa como fuente de carbono (Figura 30), estudiamos el crecimiento de las dos levaduras en medio mínimo líquido con este mismo azúcar como única fuente de carbono. Si bien ambas levaduras fueron capaces de crecer en este medio, *W. navarrensis* alcanzó una densidad de crecimiento mayor que *W. onychis*, indicando que aunque

esta última es capaz de asimilar celobiosa, no la metaboliza tan eficientemente como *W. navarrensis* (Figura 35).

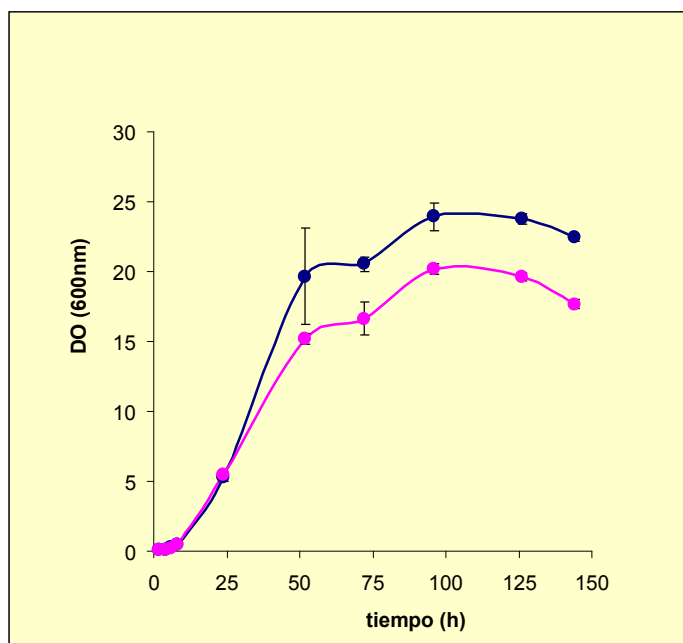


Figura 35. Crecimiento de *W. navarrensis* (■) y *W. onychis* (▲) en medio mínimo con D-Celobiosa como fuente de carbono (SCel), con agitación a 200 rpm a 30°C. Las barras de error indican la desviación estándar de triplicados.

1.7 Análisis de la capacidad transfructosilante de *W. navarrensis*

Una vez caracterizada la levadura, el siguiente paso fue determinar si presentaba o no enzimas con capacidad de sintetizar FOS a partir de sacarosa. Se determinó la actividad invertasa global tanto en el medio de cultivo como asociada a células, a partir de cultivos crecidos en YPD a 30°C durante 24 h. La actividad determinada en el medio fue de 0.54 U/ml mientras que en el pellet de células resuspendido en el mismo volumen fue de 2.37 U/ml (Figura 36). El cromatograma del producto de la reacción de transfructosilación utilizando el sobrenadante y el pellet fue idéntico,

detectándose cierta síntesis de 6-kestosa y 1-kestosa. Esto indica que *W. navarrensis* está dotada de alguna enzima secretable que degrada sacarosa y que además es capaz de sintetizar FOS como reacción lateral.

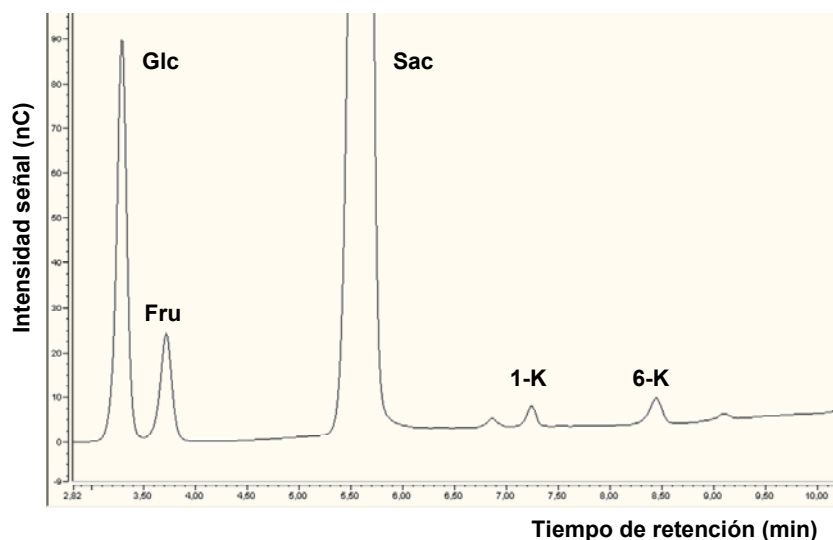


Figura 36. Cromatograma de los productos de transfructosilación tras incubar 0.03 U/ml del sobrenadante del cultivo de *W. navarrensis* con sacarosa 1.75 M, durante 24 h a 50°C. Glc: glucosa, Fru: fructosa, Sac: sacarosa, 1-K: 1-kestosa y 6-K: 6-kestosa.

1.8 Estudio de la invertasa de *W. navarrensis* sp. nov.

Con el propósito de buscar genes en *W. navarrensis* con capacidad transfructosilante se diseñaron cebadores degenerados a partir de alineamientos de secuencias de genes que codifican enzimas (invertasas, inulinasas y transferasas) pertenecientes a la familia GH32 de diferentes levaduras. Esto permitió amplificar y secuenciar la zona central de un gen de la levadura estudiada. Para obtener la secuencia completa del gen, se utilizó la ya mencionada variante del Genome Walking. Dicha secuencia correspondió al gen de una invertasa, ya que las enzimas que mostraron mayor identidad de secuencia polipeptídica con la enzima que encontramos (Figura 37) fueron las invertasas P40912.1 de *Wickerhamomyces anomalus* y

O94224 de *Pichia jadinii*. En ella se encuentran los tres motivos conservados de la familia GH32: WMNDPNG, RDP y EC. La actividad transfructosilante asociada a esta enzima expresada en *E. coli* se estudió en paralelo a la de la invertasa de *S. cerevisiae* (ver apartado 2.5).

```

MNTKASTLILSKDNYARMVQITALFALSVALLFPTTVHSSQYNRPLGHFTPSHGWMNDP
NGMFYDRSTDIWHLYYQYNPNGTWGLPLYWGHATSKDLITWDHHDPPIGPNRDDEGIF
SGSIVVDRNNTSGFFAEDSNPEQRVVAFYTYNDKNNYQTQDISYSSDGGYTFTKYENNP
VINVTSQQQRDPKVLWHEESQKWIMVLAKSQEYKVQFYASENLKEWNLVSNFTGGYFGY
QYECPLFKLPVTNPKVGQATEKWVLVLAINPGSPIGGSINQYFIGDFDGTETFKADDTA
TRFMDVGKDFYAFQSFENTKSEDGQVGLAWASNWQYANVVPTDEWRSSMSLARRYSLRN
VDYNPEHNDLVLIQDPIKDALKIQATYSVENVELFDDACVKTGFNDSVTGVLDNFLTFS
LTDEPFLWENHTSFNIDIVSEDRSEKFTVGFDVKVGQYFIDRHTHEHPQAENPFFTERF
SHYVEQYGKNEQGLGVFQVYGIIDRNIAELYFNQGSSVATYTTFFTEGSLPANIEVTTQ
SDVPVVNIDSFVANKLII

```

Figura 37. Estructura primaria de la invertasa de *W. navarrensis*. La secuencia polipeptídica completa consta de 549 aminoácidos. Se muestra en azul el péptido señal, en morado la metionina de inicio y en verde oscuro el dominio C-terminal. Los tres motivos conservados de enzimas de la familia GH32 están resaltados en gris y los aminoácidos catalíticos en rojo.

2 ANÁLISIS BIOQUÍMICO E INGENIERÍA MOLECULAR DE LA INVERTASA SUC2 DE *S. cerevisiae*

2.1 Análisis estructural

En paralelo al trabajo experimental dirigido a obtener la estructura tridimensional de Suc2 mediante difracción de rayos X (ver apartado siguiente), llevamos a cabo el modelado estructural de la invertasa de *S. cerevisiae*. Para ello se utilizó como molde la invertasa de *Schwanniomyces occidentalis* (con código PDB 3KF5) que muestra una identidad de secuencia con la invertasa de *S. cerevisiae* del 48%. Se ha determinado que las predicciones estructurales utilizando modelos con más del 40% de identidad presentan un elevado grado de precisión, con menos de 2Å RMSD (desviación del valor cuadrático medio) respecto a las coordenadas de la estructura resuelta experimentalmente (Schwede et al. 2008). La predicción

de la estructura secundaria de la invertasa de *S. cerevisiae* obtenida por el programa I-TASSER se muestra en la Figura 38.

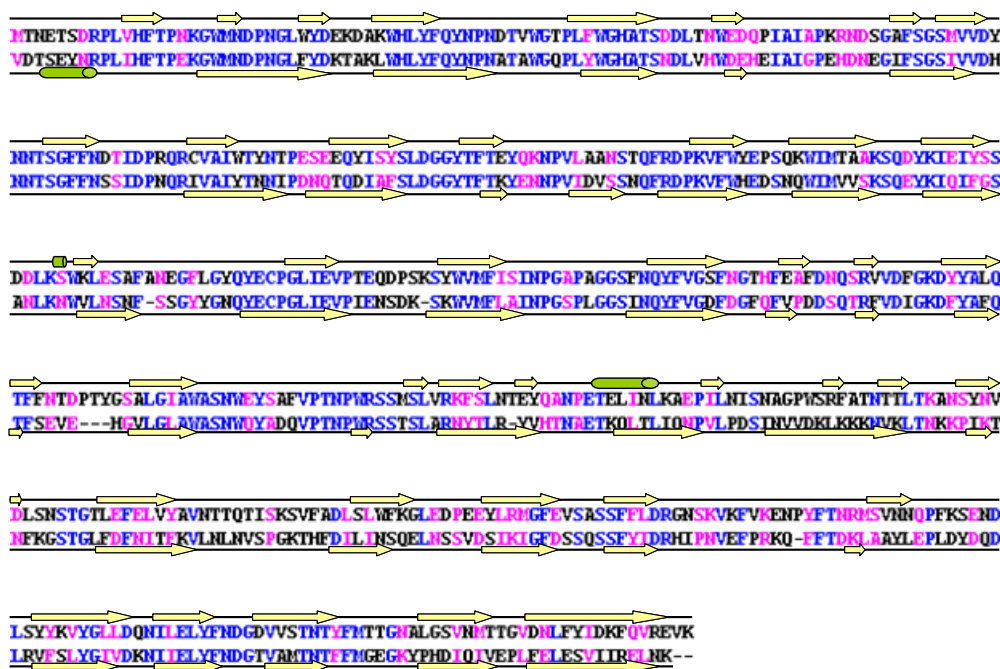


Figura 38. Alineamiento estructural entre las invertasas de *S. cerevisiae* (secuencia superior) y *S. occidentalis* (secuencia inferior) obtenido por el programa I-TASSER (Roy et al. 2010, Zhang 2008, Zhang 2009). En la parte inferior se muestran los elementos de estructura secundaria determinados experimentalmente para la invertasa de *S. occidentalis*. En la parte superior se indica la predicción de los elementos de estructura secundaria. Las flechas amarillas indican hebras β y los cilindros verdes α -hélices.

El modelo obtenido para la invertasa de *S. cerevisiae* (Figura 39) mostró la típica estructura terciaria de las enzimas de la familia GH32, formada por dos dominios. El dominio catalítico N-terminal con estructura β -propeller tiene 5 aspas, cada una de las cuales consta de 4 hebras β antiparalelas con la clásica topología “w” alrededor del eje central (Lammens et al. 2009). Este dominio contiene los 3 aminoácidos conservados situados en el bolsillo axial profundo del centro activo. El dominio C-terminal consiste

en 2 láminas β compuestas por 6 hebras β antiparalelas formando un plegamiento tipo β -sándwich.

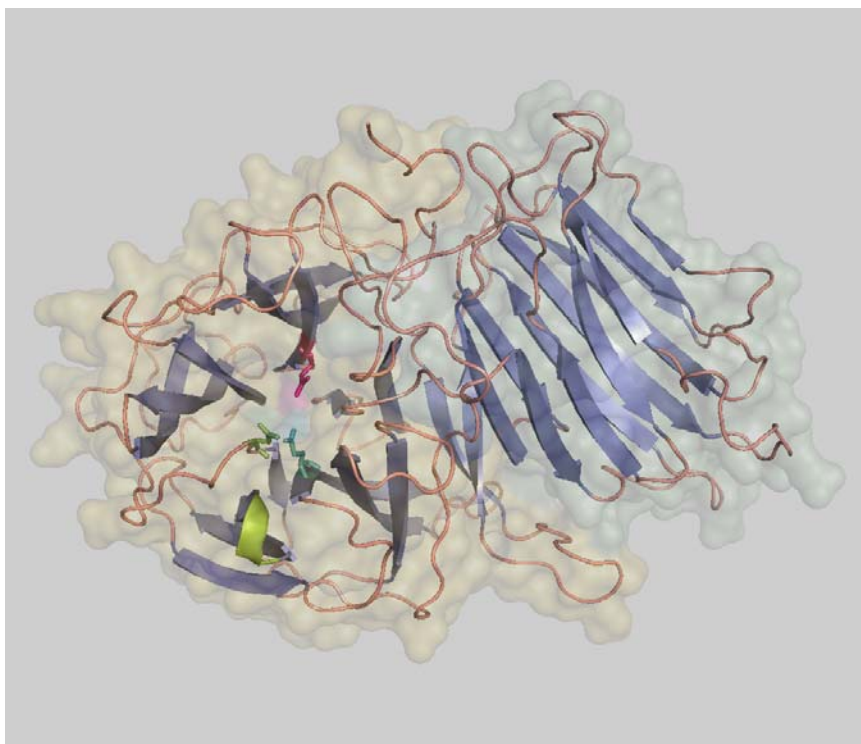


Figura 39. Modelo estructural de la invertasa de *S. cerevisiae* (Suc2). En azul se muestran las hebras β y en amarillo las α hélices. Se han resaltado los residuos D22 (rojo), D151 (verde) y E203 (azul cian) que forman la tríada catalítica. Asimismo se representa la superficie molecular de la enzima distinguiendo los dos dominios de la proteína, en amarillo claro el dominio Amino-terminal (catalítico) y el Carboxi-terminal en verde.

Como ya se ha comentado, los tres residuos conservados del dominio β -propeller, dos aspárticos y un glutámico, que forman la tríada catalítica, son indispensables para la unión a sustrato y la catálisis y se localizan en tres motivos de secuencias conservados. En el caso de la invertasa de *S. cerevisiae* el aspártico nucleófilo está situado en la posición 22 (motivo WMNDPNG) y el glutámico ácido-base en la 203 (motivo EC), mientras que el aspártico 151 (motivo RDP) sería el residuo estabilizador del estado de transición. La orientación de las cadenas laterales de estos tres residuos en

el modelo estructural es la adecuada para el papel asignado a cada uno de ellos (Figura 40A), lo que apoya la precisión del modelo en la conformación del centro activo. Además, en posiciones estructuralmente homólogas a las de otras enzimas de la familia GH32 se encuentran los residuos que componen el llamado bolsillo hidrofóbico del centro activo implicado en la unión al sustrato (sacarosa) (Figura 40B) (Lammens et al. 2009).

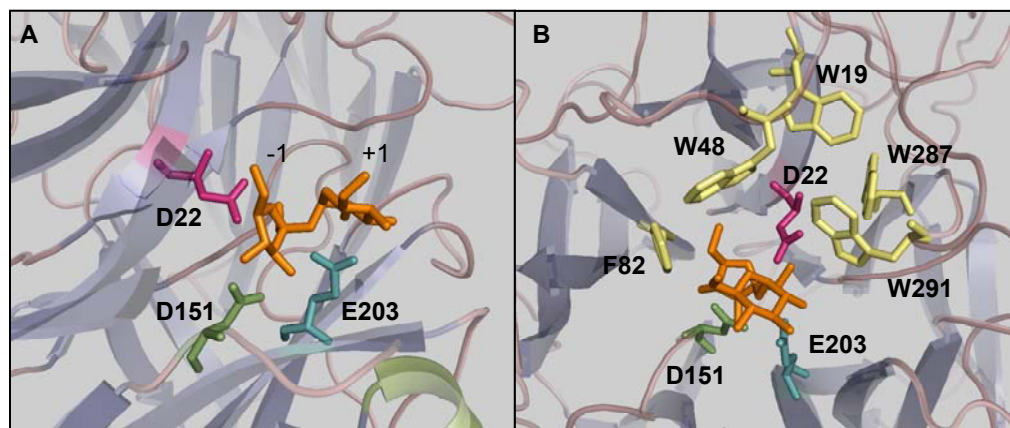


Figura 40. Centro catalítico de la invertasa de *S. cerevisiae* según el modelo estructural obtenido en este estudio. El aminoácido catalítico nucleófilico es el aspártico 22, el ácido-base el glutámico 203 y el aspártico estabilizador del estado de transición es el 151. La localización de la molécula sustrato, en naranja, se obtuvo superponiendo las coordenadas de la estructura resuelta de una invertasa de *Arabidopsis thaliana* en complejo con sacarosa (PDB 2QQW). Las posiciones -1 y +1 según la nomenclatura utilizada para enzimas que unen azúcares (Davies et al. 1997) corresponden al grupo fructosilo y glucosilo de la sacarosa respectivamente (A). Los residuos que componen el bolsillo hidrofóbico del centro activo se resaltan en amarillo (B).

2.2 Expresión de Suc2 en *E. coli* y cristalización de la proteína purificada.

Para obtener la estructura de una enzima por difracción de rayos X inicialmente se requiere disponer de una elevada cantidad de proteína purificada (al menos 500 µl de una concentración >8 mg/ml) de forma que se pueda llevar a cabo el rastreo de múltiples condiciones de cristalización. Por

ello, en primer lugar, procedimos a optimizar las condiciones de expresión de *SUC2* en *E. coli* para obtener suficiente cantidad de proteína heteróloga y facilitar su posterior purificación.

En ensayos iniciales se incorporaron elementos reguladores tipo Shine-Dalgarno en la zona 5' UTR del gen *SUC2*, para su clonación posterior en un vector pUC18, que contiene a su vez el promotor *lac*, inducible por IPTG. Tras la transformación de diferentes cepas de *E. coli* (XL-1 Blue, DH5 α , M15, SG13009) con esta construcción sólo se llegó a detectar una baja actividad invertasa antes y después de inducir con IPTG (resultados no mostrados), lo que sugería que los niveles basales de expresión en ausencia de IPTG podían ser tóxicos para la célula. Se decidió utilizar entonces un vector de expresión de *E. coli* (pET-3b) que contiene el promotor T7 y transformar con la construcción resultante distintas cepas de *E. coli* (BL21, JM109) portadoras del lisógeno DE3. Esta región codifica la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lac*, y contiene además una copia del gen *lacI*, que codifica el represor *lac*. Los resultados obtenidos fueron similares a los del sistema anterior. Por último, se empleó el vector de expresión pQE80L (Qiagen), mediante el cual se consigue una sobreexpresión del gen *lacI* y que además consta de un elemento promotor-operador optimizado con dos secuencias del operador *lac*, que incrementan las posibilidades de unión del represor *lac* en ausencia de IPTG. De esta manera se asegura una eficiente represión de la expresión basal del gen insertado antes de la inducción. Con la construcción resultante (pQE80-SUC2) y utilizando la cepa XL1-Blue como huésped se consiguió una expresión relativamente eficiente de *SUC2* en un amplio rango de condiciones de inducción. Otro factor que se tuvo en cuenta es que la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* puede estar limitada si los codones del gen correspondiente son de bajo uso en esta bacteria. En concreto, 9 de los 13 residuos de arginina en *SUC2* son codificados por codones raros (es decir, codones para los cuales hay un bajo número de tRNAs) en *E. coli*. Para evitar esta restricción se hizo uso de la cepa Rosetta2 como huésped de la construcción pQE80-SUC2. Esta cepa contiene el plásmido pRARE2, que codifica una serie de tRNAs correspondientes a codones raros en *E. coli*, y con ella se consiguió mejorar considerablemente la expresión de *SUC2* en las mismas condiciones de inducción que las empleadas anteriormente (medio LB, durante 2-6 horas a 37°C). Sin embargo, aun en este caso, la proteína heteróloga no constituía una fracción importante de la proteína total de la célula y además se observó

la formación de productos de degradación. Finalmente se consiguió optimizar la expresión de invertasa y evitar su degradación utilizando como medio de cultivo 2XTY y reduciendo la temperatura de inducción a 12°C (Figura 41A).

En estas condiciones óptimas de expresión se escaló la producción de Suc2 en *E. coli* y se purificó la proteína por cromatografía de afinidad con una columna de níquel (Figura 41B), aprovechando la presencia de 6 histidinas en posición amino terminal de la secuencia proteica incorporadas por el vector pQE-80L.

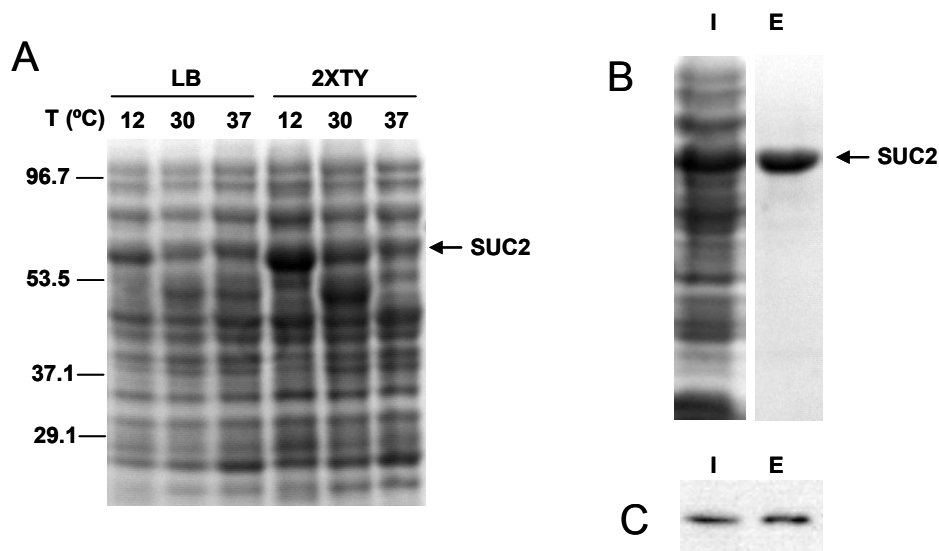


Figura 41. Expresión y purificación de Suc2 en *E. coli*. **A)** Optimización de las condiciones de inducción. Cultivos de Rosetta2/pQE-SUC2 en dos medios distintos (LB y 2XTY) se incubaron hasta una densidad óptica de 0.5 y se indujo la expresión de SUC2 con IPTG 5 mM a 12, 30 o 37°C durante 14, 6 o 2 horas respectivamente. La fracción soluble de los extractos celulares se analizó por SDS-PAGE. A la izquierda se indican los pesos moleculares (kDa) y la migración de patrones de proteína. La migración de Suc2 se muestra con una flecha. **B)** Purificación de Suc2 mediante cromatografía de afinidad con una columna de Ni²⁺. El extracto soluble de células Ros-pQE-SUC2 crecidas en medio 2XTY e inducidas con IPTG 5 mM durante 14 horas a 12°C se inyectó en una columna HisTrapFF acoplada a un cromatógrafo ÄKTA (GE HealthCare). La proteína unida se eluyó con un gradiente de imidazol. Se muestra la tinción con Coomassie de las muestras inyectada (I) y eluída (E) analizadas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). **C)** Confirmación de la identidad de la proteína purificada. Las muestras inyectada (I) y eluída (E) de la columna HisTrapFF se analizaron por SDS-PAGE e inmunodetección con anticuerpo anti-His.

Muestras puras y concentradas de la invertasa (8-10 mg/ml) están siendo actualmente empleadas en ensayos de cristalización. En el transcurso de la presente tesis doctoral se han ido mejorando la calidad y tamaño de los cristales obtenidos (Figura 42). Recientemente se ha conseguido un patrón de difracción de rayos X de la invertasa Suc2 a 3.3- 3.4 Å y se espera que próximamente se puedan obtener cristales mejorados para aumentar esta resolución.

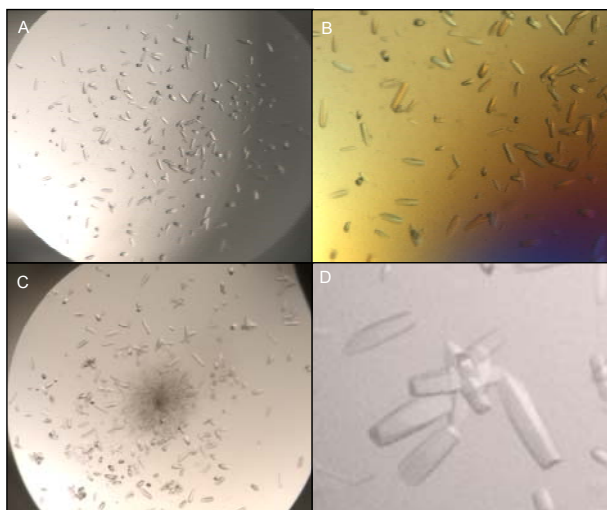


Figura 42. Cristales de la invertasa de *S. cerevisiae* obtenidos a partir de la proteína purificada utilizando las siguientes condiciones en el tampón del reservorio: **A)** 0.1 M Formiato Magnésico, 3% Peg 3350, 80 mM Sulfato Amónico, 0.1 M Bis/Tris pH 6.7. **B)** 0.1 M Formiato Magnésico, 3% Peg 3350, 80 mM Sulfato Amónico, 0.1 M Bis/Tris pH 6.7 visualizado con polarizador. **C)** 0.3 M Formiato Magnésico, 3% Peg 3350, 80 mM Sulfato Amónico, 0.1 M Bis/Tris pH 6.7. **D)** 0.6 M Formiato Magnésico, 3% Peg 3350, 0.1 M Bis/Tris pH 6.5, 5% MPD, adicionando 1 mM TCEP (1,2,3-tris(2-cianoetoxi)propano) y 75 mM Cloruro de Guanidinio a la muestra.

2.3 Estudio funcional del dominio Carboxi-terminal

Como se ha explicado anteriormente, las enzimas de familias 32 y 68 de glicosil-hidrolasas se agrupan en un mismo clan, denominado GH-J. Las enzimas de este clan se caracterizan por poseer un dominio β -propeller en el

que se sitúa el centro catalítico. Adicionalmente, la mayoría de las enzimas de la familia GH32 contienen un dominio β -sándwich carboxi-terminal que está ausente en las de la familia GH68 (Figura 7). Para estudiar la implicación del dominio carboxi-terminal en la actividad y/o estabilidad de Suc2 se diseñó una versión del gen *SUC2* en la que se delecionó la secuencia codificante de este dominio. Al transformar *E. coli* con la construcción resultante (pQE80-*SUC2* Δ) que mantiene intacta la secuencia del dominio catalítico, no se pudo detectar una síntesis apreciable de la proteína heteróloga en forma soluble. Esto sugiere que el dominio β -sándwich puede jugar un papel importante en la estabilidad estructural de la invertasa de *S. cerevisiae*.

2.4 Análisis de la estructura cuaternaria de Suc2

Nos propusimos estudiar mediante cromatografía de exclusión molecular la estructura cuaternaria de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae*, analizando el grado de oligomerización de la proteína a pH 7. La invertasa Suc2 eluyó a los 10.5 ml, lo que supone que el holoenzima tiene un peso molecular de 428 kDa. Este resultado indicaría, comparando con el tamaño esperado para una cadena polipeptídica de Suc2 (58 kDa), un grado de oligomerización de 7.4, lo que sugiere una probable estructura octamérica (Figura 43).

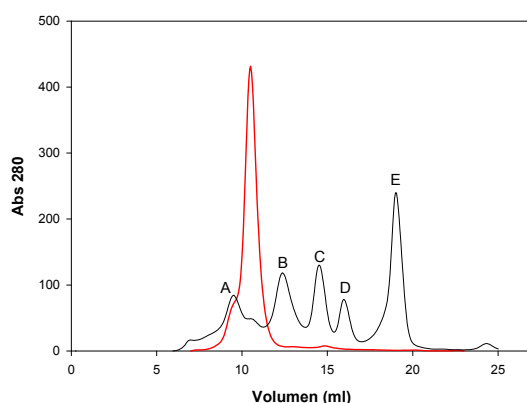


Figura 43. Cromatograma obtenido por exclusión molecular de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae*, en rojo, junto con patrones de peso molecular conocido, en negro (A: 670 kDa, B: 158 kDa, C: 44 kDa, D: 17 kDa y E: 1.35 kDa).

2.5 Estudio comparativo de la actividad transfructosilante de Suc2 frente a otras enzimas de la familia GH32

En la bibliografía hay descritas una serie de enzimas pertenecientes a la familia GH32 que incluyen invertasas, inulinasas y transferasas que presentan distinta capacidad transfructosilante (Goosen et al. 2007, Hidaka et al. 1988, L'Hocine et al. 2000, Nguyen et al. 1999, Rehm et al. 1998, Wang y Rakshit 2000). Nos propusimos comparar la capacidad transfructosilante de la invertasa Suc2 (código UniProt P00724) de *S. cerevisiae* con algunas enzimas de esta familia bajo las mismas condiciones de reacción. Para tal fin seleccionamos la invertasa de *W. navarrensis* (capítulo I de la presente tesis doctoral), la inulinasa de *K. marxianus* (P28999) y la exo-inulinasa de *A. niger* (A2R0E0). Esta última, presenta una secuencia de aminoácidos 100% idéntica a una proteína de *A. foetidus* clasificada como fructosiltransferasa por su capacidad para formar fructooligosacáridos (Rehm et al. 1998). Como control negativo se ensayó un mutante inactivo (D22N) de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae*.

El análisis del extracto celular soluble tras la inducción con IPTG por SDS-PAGE y tinción Coomassie no mostró ninguna banda diferencial del tamaño esperado (60 kDa) para la invertasa de *W. navarrensis*, comparado con el patrón de proteínas de una cepa no transformada (Figura 43A). Sin embargo, la expresión de esta proteína sí fue detectable por western-blot (inmunodetección) (Figura 44B). Por el contrario, el análisis de la expresión de la proteína mutante de Suc2 D22N, la inulinasa de *K. marxianus* y la exo-inulinasa de *A. niger* sí mostró una banda diferencial del tamaño esperado (alrededor de 60 kDa en todos los casos) (Figura 44 C, D y E). Asimismo se confirmó que todas las proteínas producidas en *E. coli* a excepción de Suc2 D22N, tenían actividad invertasa (Tabla 22).

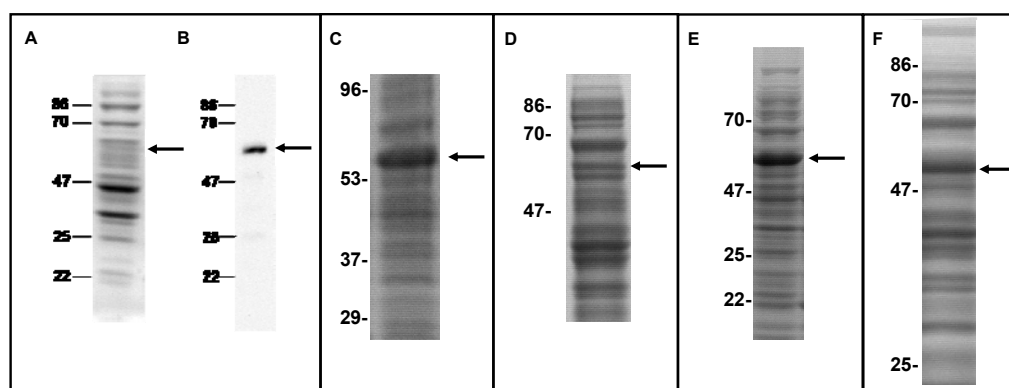


Figura 44. Expresión del gen *INV* de *W. navarrensis* (A y B), *INU* de *K. marxianus* (C), *INU1* de *A. niger* (D), mutante Suc2 D22N (E) y Suc2 wt de *S. cerevisiae* (F) en *E. coli*. La fracción soluble del extracto celular se analizó por SDS-PAGE y tinción Coomassie (A, C, D, E y F) o inmunodetección con anticuerpo anti-His (B). En cada caso, se indican a la izquierda los pesos moleculares (kDa) y la migración de los patrones de proteína. La flecha en A indica la migración de la proteína *INV* de *W. navarrensis*, determinada experimentalmente según el resultado obtenido en B). Las flechas en C, D, E y F indican las bandas que corresponden a la inulinasa, exo-inulinasa, invertasa D22N e invertasa wt respectivamente.

Tabla 22. Actividad invertasa ($\mu\text{mol glucosa}/(\text{min}\cdot\text{ml ex})$) en el extracto soluble de los transformantes medida a 50°C y pH 4.8 frente a sacarosa 1.75 M.

Actividad enzimática	
Invertasa de <i>W. navarrensis</i>	70
Inulinasa de <i>K. marxianus</i>	360
Exo-inulinasa de <i>A. niger</i>	730
Invertasa wt de <i>S. cerevisiae</i>	2800
Invertasa D22N de <i>S. cerevisiae</i>	0

Las cuatro enzimas ensayadas presentaron cierta capacidad transfructosilante, con un patrón de producción de FOS muy similar y ninguna de ellas sobresalió de manera especial sobre el resto en cuanto a la efectividad en la producción total de FOS. Asimismo se comprobó analizando el mutante D22N que el extracto celular soluble de *E. coli* no presentaba

ninguna enzima con actividad hidrolítica ni transfructosilante (Figura 45). Se observaron ligeras diferencias en la especificidad del producto de transfructosilación. Las invertasas de *W. navarrensis* y *S. cerevisiae* y la inulinasa de *K. marxianus* sintetizaron principalmente 6-kestosa mientras que la exo-inulinasa de *A. niger* produjo cantidades similares de ambos FOS (Tabla 23). El patrón de FOS obtenido a partir de la invertasa de *W. navarrensis* secuenciada en el presente trabajo (Figura 45) coincide con el observado cuando se utilizó el sobrenadante del medio de cultivo de *W. navarrensis* (Figura 36).

En base a los resultados anteriores, escogimos la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae* como herramienta para la producción de FOS por provenir de un microorganismo de amplio uso alimentario y por sus características particulares que permiten una fácil manipulación mediante ingeniería genética.

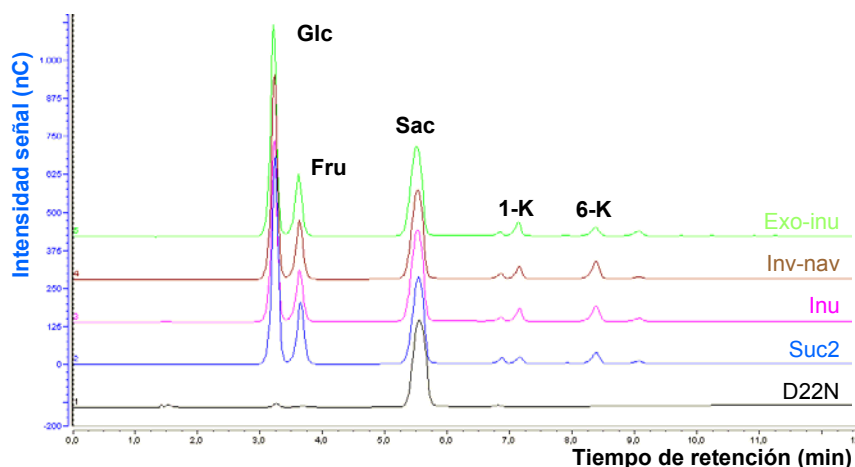


Figura 45. Cromatograma de los productos de transfructosilación de diferentes enzimas de la familia GH32. Exo-inu: exo-inulinasa de *A. niger*. Inv-nav: invertasa de *W. navarrensis*. Inu: inulinasa de *K. marxianus*. Suc2: invertasa de *S. cerevisiae*. D22N: mutante inactivo de la invertasa de *S. cerevisiae*. Se incubaron 0.3 U/ml de enzima con sacarosa 1.75 M, durante 24 h a 50°C. En paralelo se incubó en las mismas condiciones el extracto soluble del transformante D22N diluido 1/10. Glc: glucosa, Fru: fructosa, Sac: sacarosa, 1-K: 1-kestosa y 6-K: 6-kestosa.

Tabla 23. Porcentajes de producción de glucosa (Glc), fructosa (Fru), 1-kestosa (1-K) y 6-kestosa (6-K) así como la relación glucosa/fructosa de las cuatro enzimas respecto al total de azúcares de la mezcla.

	Suc2	Inu	Inv-nav	Exo-inu
Glc	12,9	10,6	12,2	12,8
Fru	9,4	7,3	8,4	9,1
Glc/Fru	1,37	1,46	1,45	1,41
1-K	0,71	1,48	1,36	1,88
6-K	1,8	2,4	2,8	1,3

2.6 Mejora de la actividad transfructosilante de Suc2

Nos planteamos mejorar la eficiencia de producción de FOS mediante el diseño racional de mutaciones dirigidas basándonos en distintas aproximaciones descritas a continuación:

Incremento de la hidrofobicidad en el entorno catalítico.

La Sucrosa:Sucrosa 1-Fructosiltransferasa (1-SST) de *A. foetidus* (O42801) (Rehm et al. 1998), una enzima descrita en la bibliografía por su capacidad de sintetizar FOS, presenta dos zonas próximas al centro catalítico, que denominaremos aquí GVW y VVV, con una secuencia divergente respecto de la invertasa de *S. cerevisiae* (Figura 46) y con un grado medio de hidrofobicidad (índice GRAVY) positivo, indicativo de secuencias hidrofóbicas. Por el contrario, los residuos en las regiones homólogas de *S. cerevisiae* tienen un índice GRAVY negativo característico de secuencias hidrofílicas (Tabla 24). Se puede plantear la hipótesis de que el incremento de la hidrofobicidad en la zona cercana al centro catalítico podría disminuir la proporción de moléculas de agua respecto a las de sacarosa, lo que favorecería la transfructosilación sobre la hidrólisis.

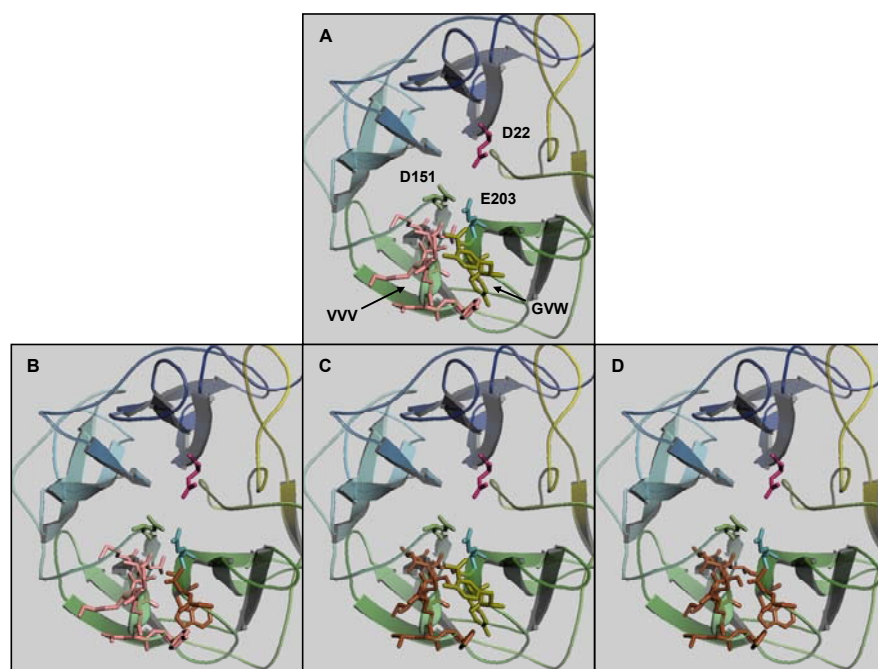


Figura 47. Vista ampliada del centro activo de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae* según el modelo estructural obtenido en este estudio. Se señalan los residuos catalíticos (D22, D151 y E203), así como las regiones GVW y VVV. **A:** Suc2 nativa, **B:** Suc2 GVW, **C:** Suc2 VVV y **D:** Suc2 GVW/VVV. Los residuos que se mutaron están coloreados en marrón.

La actividad enzimática de Suc2-GVW fue del orden de la enzima wt. En relación a los transformantes Suc2-VVV y Suc2-GVW/VVV, a pesar de que la mayor parte de la proteína heteróloga sintetizada es insoluble, una pequeña porción se mantiene en el sobrenadante ya que se detectó cierta actividad (Tabla 25).

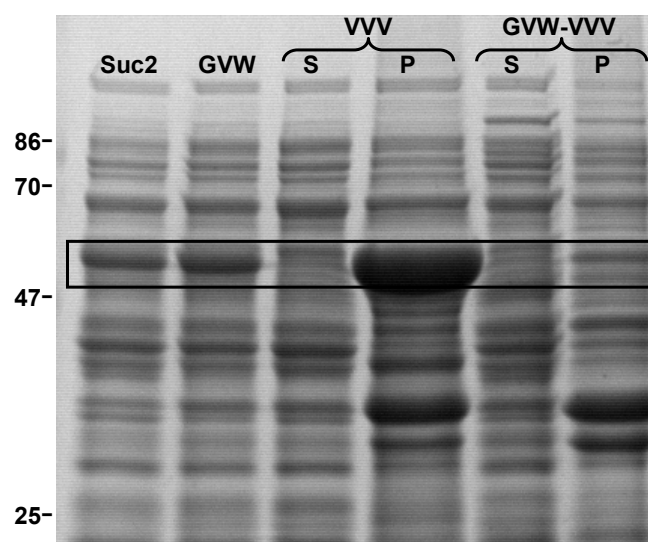


Figura 48. Análisis por SDS-PAGE de la producción de Suc2, Suc2 GVW, Suc2 VVV y Suc2 GVW/VVV a partir de extractos celulares de *E. coli*. S: fracción soluble; P: fracción insoluble. Las bandas que corresponderían con las proteínas de interés son las que están dentro del recuadro. A la izquierda se indican los pesos moleculares (kDa).

Tabla 25. Actividad invertasa (μmol glucosa/(min·ml ex)) en el extracto soluble de los transformantes de la invertasa Suc2 nativa y de los mutantes medida a 50°C y pH 4.8 frente a sacarosa 1.75 M.

Activ. enzimática	
wt	2800
Suc2-GVW	2200
Suc2-VVV	26
Suc2-GVW/VVV	22

El análisis de la capacidad transfructosilante de las enzimas mutagenizadas junto con la invertasa wt de *S. cerevisiae* indicó que el mutante Suc2-GVW muestra una capacidad transfructosilante similar a la de la enzima wt. En cambio, Suc2-VVV presentó una mayor capacidad transfructosilante que la enzima nativa, sintetizando alrededor del doble de 6-Kestosa para la misma cantidad de glucosa liberada (Figura 49).

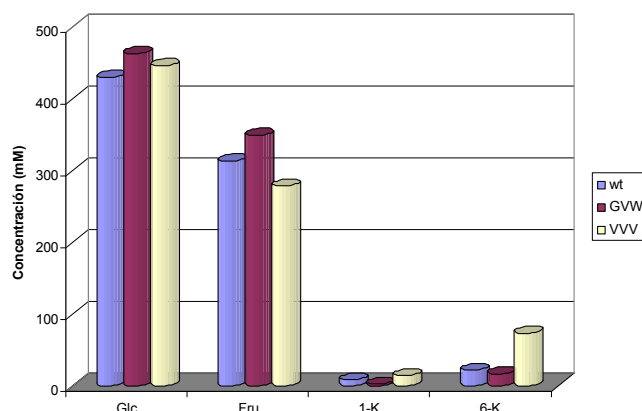


Figura 49. Producción de distintos azúcares tras la incubación de la enzima nativa y los mutantes Suc2-GVW y Suc2-VVV. La reacción se llevó a cabo incubando 0.15 U/ml de enzima junto con sacarosa a una concentración final de 1.75 M a un pH de 4.8 durante 24-48 h a 50°C. Glc: glucosa; Fru: fructosa; 1-K: 1-kestosa; 6-K: 6-kestosa.

Modificación del bolsillo hidrofóbico del centro activo

Se han encontrado divergencias de secuencia entre fructosilhidrolasas y fructosiltransferasas en alguno de los residuos que conforman el bolsillo hidrofóbico característico de enzimas de la familia GH32. Así, dentro del motivo WMNDPNG las invertasas de la familia GH32 tienen un Trp conservado (Trp19 en Suc2), mientras que en fructosiltransferasas se encuentra una tirosina o fenilalanina en la posición homóloga (Figura 50) (Lammens et al. 2009). Además, la mutación W161Y incrementó la producción de 1-kestosa en la invertasa de *A. cepa* (Ritsema et al. 2006). Por ello, se llevó a cabo la mutación W19Y en Suc2 con el propósito de analizar si esta modificación afectaría a su capacidad de transfructosilación.

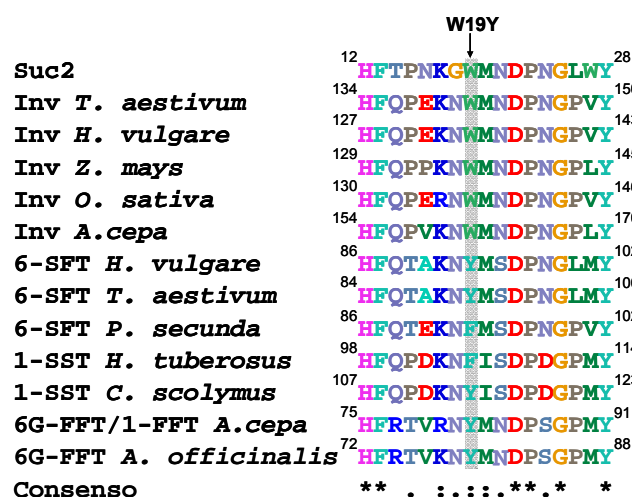


Figura 50. Alineamiento de la secuencia polipeptídica de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae* junto con diferentes invertasas y transferasas de plantas en el entorno del motivo WMNDPNG. Inv *T. aestivum* (Q575T1-1), Inv *H. Vulgare* (Q6KCH6-1), Inv *Z. mays* (P49175-1), Inv *O. sativa* (Q9LKI9-1), Inv *A. cepa* (O81083), 6-SFT *H. vulgare* (Q96466-1), 6-SFT *T. aestivum* (Q8W431-1), 6-SFT *P. secunda* (Q9FR47-1), 1-SST *H. tuberosus* (O81986-1), 1-SST *C. scolymus* (O23786-1), 6G-FFT/1-FFT *A. cepa* (P92916-1), 6G-FFT *A. officinalis* (Q5FC15). Está marcada con una flecha la mutación realizada en Suc2 del residuo W del bolsillo hidrofóbico.

Entre las enzimas de plantas de la familia GH32 se ha observado variabilidad de secuencia en otro de los residuos del bolsillo hidrofóbico, localizado en el motivo W[G/S][W/Y]. En concreto, el tercer residuo de este motivo es un Trp en invertasas y una Tyr en transferasas. Mediante la mutación W440Y en una invertasa de *A. cepa*, se consiguió doblar la capacidad transfructosilante de la enzima (Altenbach et al. 2009). En el caso de enzimas bacterianas y fúngicas, esta región difiere de las enzimas de plantas a nivel de secuencia primaria (Figura 51). Sin embargo, pudimos determinar el homólogo estructural del Trp440 de *A. cepa* (Trp297 de *A. thaliana*), mediante el alineamiento estructural del modelo de Suc2 y la estructura cristalográfica de la invertasa de *A. thaliana* (Figura 52). Se determinó que el Trp287 de Suc2 se situaría en la misma posición que el Trp440 de la invertasa de *A. cepa*, mientras que el Trp291 de Suc2 se localizaría en la zona de entrada al centro activo (Figura 53). Con estos antecedentes se diseñaron otros tres mutantes de Suc2: W287Y, W291Y y el

mutante WGY donde la secuencia WASNW se sustituyó por WGY (Figura 51).

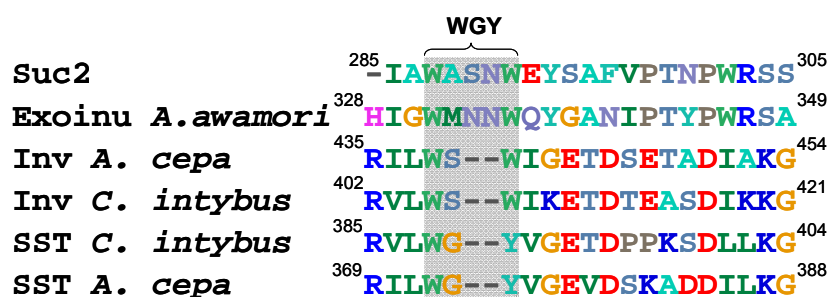


Figura 51. Alineamiento de la secuencia polipeptídica de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae* junto con enzimas vegetales de la familia GH32 alrededor del motivo W[G/S][W/Y]. Exo-inulinasa de *A. awamori* (Q96TU3), Inv *A. cepa* (O81083-1), Inv *C. intybus* (Q8RVH4-1), 1-SST *C. intybus* (O24459-1), 1-SST *A. cepa* (O81082-1).

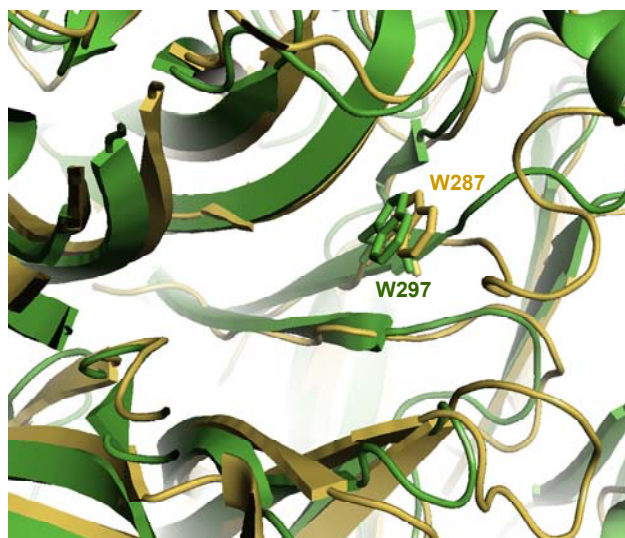


Figura 52. Superposición del modelo de la invertasa Suc2 en amarillo, con la estructura resuelta de la invertasa de *A. thaliana* (PDB 2AC1) en verde mediante el software online DaliLite. El W297 de *A. thaliana* es el homólogo del W440 de la invertasa de *A. cepa*. Se señala la posición de este residuo y de su homólogo estructural en Suc2.

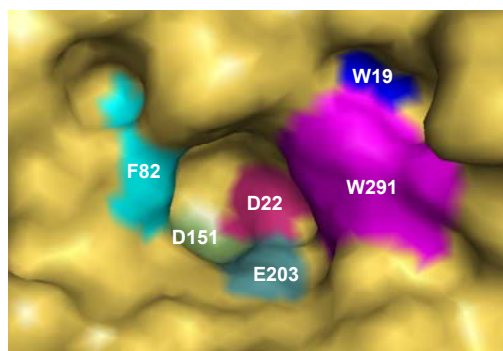


Figura 53. Visualización del denominado bolsillo hidrofóbico de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae* según el modelo estructural obtenido en este estudio. Los residuos W19, F82 y W291 estarían localizados en la superficie de la proteína mientras que el W287 se situaría detrás del W291. Se señalan también los residuos catalíticos (D22, D151 y E203).

Por último, se exploró la variabilidad de secuencia de otro residuo del bolsillo hidrofóbico localizado en el motivo denominado WSGSAT (Ozimek et al. 2006). El Trp de esta región se encuentra bastante conservado en enzimas de la familia GH68 que usan sacarosa como sustrato para sintetizar polisacáridos tipo inulina o levano. En la mayoría de fructosilexohidrolasas de la familia GH32, como ocurre en Suc2, se sustituye por una Phe (Figuras 53 y 54). De este modo, se diseñó el mutante F82W con el fin de analizar su efecto sobre las propiedades de transfructosilación (eficiencia, especificidad o procesividad) de la enzima Suc2.

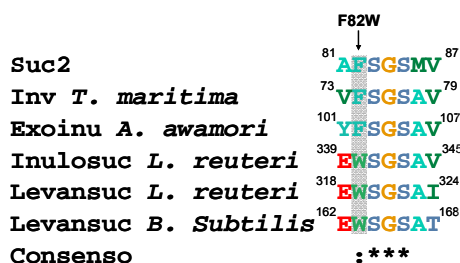


Figura 54. Alineamiento de la secuencia polipeptídica de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae* junto con enzimas del clan GH-J. Invertasa de *T. maritima* (O33833), exoinulinasa de *A. awamori* (Q96TU3), inulosucrasa de *L. reuteri* (Q8GP32) y levansucrasas de *L. reuteri* (Q8GGV4) y *B. subtilis* (P05655-1). Está marcada con una flecha la mutación que se lleva a cabo.

En la Figura 55 se muestra la posible localización estructural de los residuos modificados.

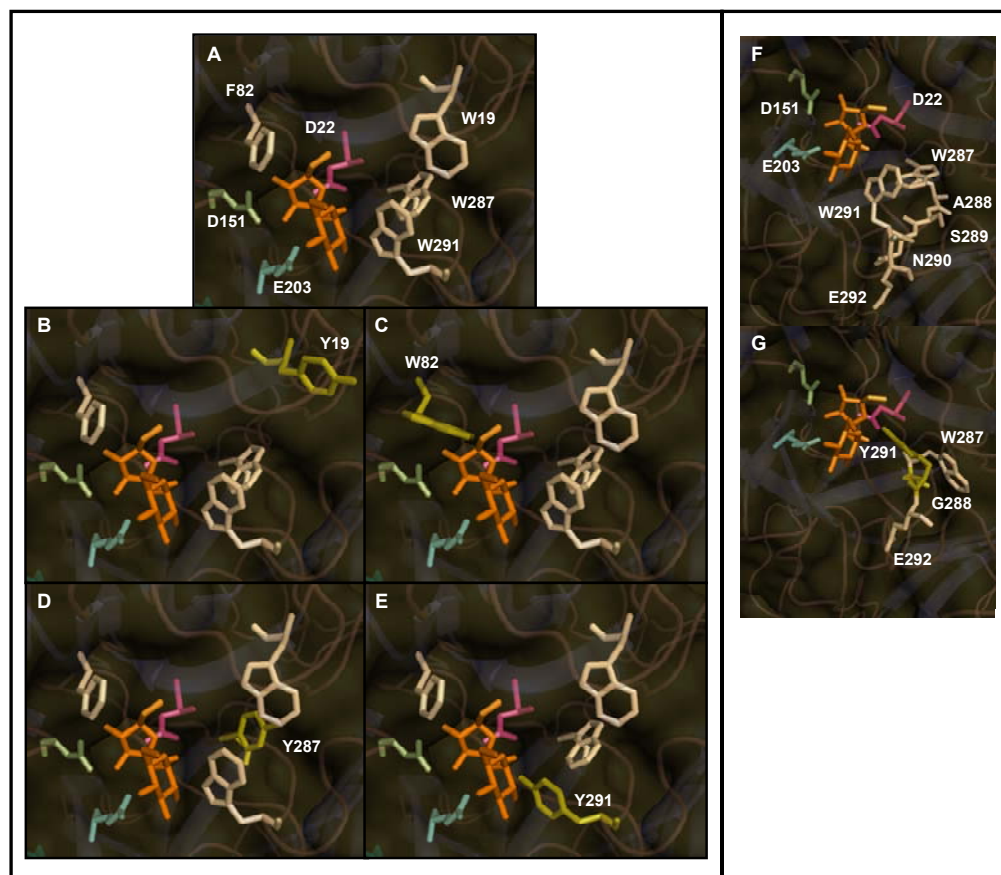


Figura 55. Vista ampliada del centro activo de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae* según el modelo estructural obtenido en este estudio. **A** y **F**: Suc2 nativa. Se señalan los residuos catalíticos (D22, D151 y E203), así como aquellos que se mutagenizaron. **B**: Suc2 W19Y, **C**: Suc2 F82W, **D**: Suc2 W287Y, **E**: Suc2 W291Y, **G**: Suc2 WGY. La localización de la molécula sustrato, en naranja, se obtuvo superponiendo las coordenadas de la estructura resuelta de una invertasa de *Arabidopsis thaliana* en complejo con sacarosa (PDB 2QQW).

Con la batería de transformantes W19Y, F82W, W287Y, W291Y y WGY se analizó en primer lugar la expresión de las distintas variantes de Suc2. Las proteínas Suc2 W19Y, F82W y W291Y se sintetizaron en forma soluble a buenos niveles mientras que W287Y y WGY no se detectaron en

forma soluble por análisis SDS-PAGE (Figura 56). Para unos niveles de proteína heteróloga similares, los transformantes F82W y W19Y presentaron una actividad específica similar a Suc2 wt, mientras que W291Y mostró una clara pérdida de actividad específica (Tabla 26). Respecto a los transformantes W287Y y WGY se detectó cierta síntesis de enzima soluble en el primer caso pero no en el segundo (Tabla 26).

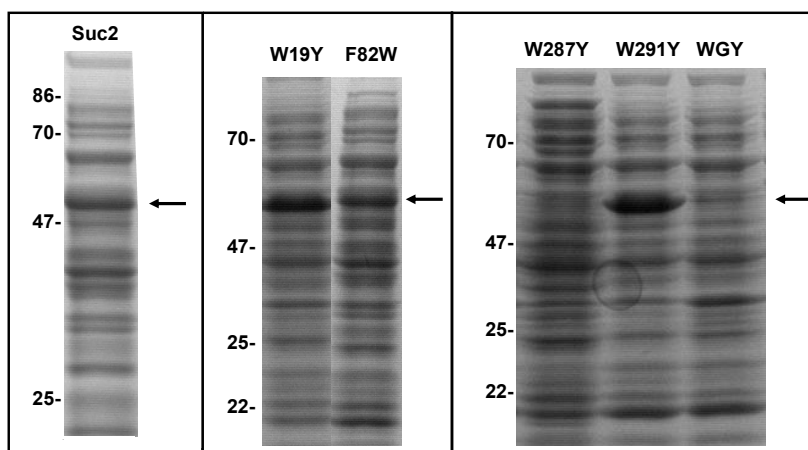


Figura 56. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de Suc2, Suc2 W19Y, Suc2 F82W, Suc2 W287Y, Suc2 W291Y y Suc2 WGY en *E. coli*. A la izquierda se indican los pesos moleculares (kDa). Las bandas que corresponderían con las proteínas de interés son las que señalan las flechas.

Tabla 26. Actividad invertasa (μmol glucosa/(min·ml ex)) en el extracto soluble de los transformantes de la invertasa Suc2 nativa y de los mutantes medida a 50°C y pH 4.8 frente a sacarosa 1.75 M.

Activ. enzimática	
wt	2800
W19Y	4700
F82W	2300
W287Y	96
W291Y	860
WGY	0

Ninguna de las enzimas mutantes sintetizadas en forma soluble en *E. coli* presentó una mayor capacidad transferasa que la Suc2 nativa (Figura 57).

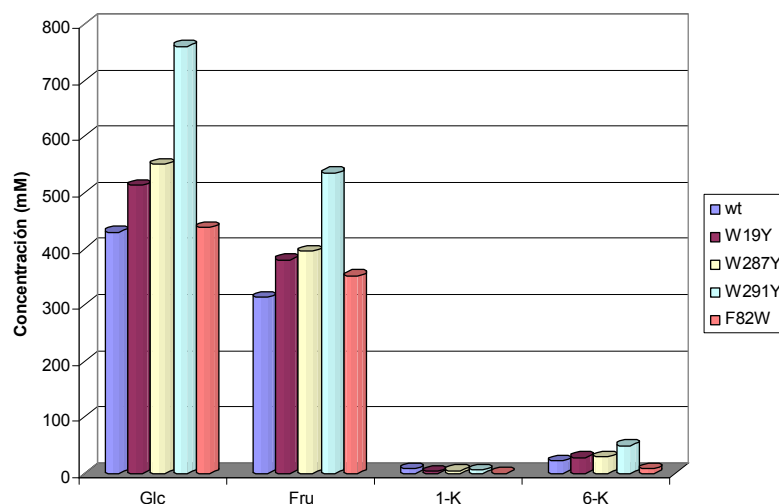


Figura 57. Producción de distintos azúcares tras la incubación de la enzima nativa y los mutantes W19Y, W287Y, W291Y y F82W. La reacción se llevó a cabo incubando 0.15 U/ml de enzima junto con sacarosa a una concentración final de 1.75 M a un pH de 4.8 durante 24-48 h a 50°C. Glc: glucosa; Fru: fructosa; 1-K: 1-kestosa; 6-K: 6-kestosa.

Modificación del motivo β -fructosidasa

El motivo β -fructosidasa (NDPNG) (Ritsema et al. 2006) es una de las regiones más conservadas entre invertasas de la familia GH32 e incluye al residuo catalítico (Asp) que actúa como nucleófilo en el mecanismo de reacción de estas enzimas. Además, esta secuencia se encuentra contigua a uno de los residuos que forman parte del bolsillo hidrofóbico del centro activo, formando parte del motivo conservado WMNDPNG. Las fructosiltransferasas de plantas contienen con cierta frecuencia Ser en posiciones homólogas a los residuos de Asn (Figura 58). Además, diversas mutaciones simples de Asn por Ser, así como combinadas con mutaciones de Trp por Tyr en el motivo WMNDPNG en invertasas de plantas mejoraron su capacidad de

transfructosilación para producir 1-kestosa (Ritsema et al. 2006, Schroeve et al. 2008). Siguiendo el ejemplo de estos trabajos previos, para este estudio se realizaron las mutaciones simples N21S y N24S así como las mutaciones dobles W19Y/N21S y W19Y/N24S. Además se incluyó la mutación triple no estudiada hasta el momento W19Y/N21S/N24S. En la Figura 59 se muestra la posible localización estructural de los residuos modificados.

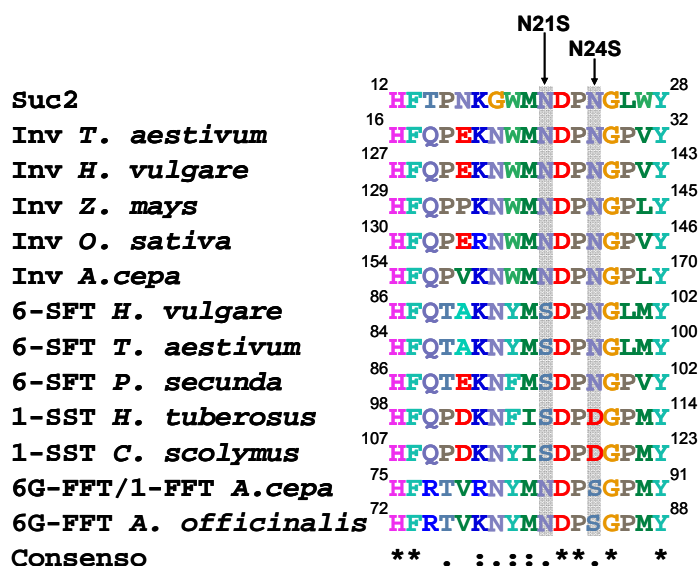


Figura 58. Alineamiento de la secuencia polipeptídica de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae* junto con diferentes invertasas y transferasas de plantas. Inv *T. aestivum* (Q575T1-1), Inv *H. Vulgare* (Q6KCH6-1), Inv *Z. mays* (P49175-1), Inv *O. sativa* (Q9LKI9-1), Inv *A. cepa* (O81083), 6-SFT *H. vulgare* (Q96466-1), 6-SFT *T. aestivum* (Q8W431-1), 6-SFT *P. secunda* (Q9FR47-1), 1-SST *H. tuberosus* (O81986-1), 1-SST *C. scolymus* (O23786-1), 6G-FFT/1-FFT *A. cepa*. (P92916-1), 6G-FFT *A. officinalis* (Q5FC15). Están marcadas con flechas las mutaciones que se llevan a cabo.

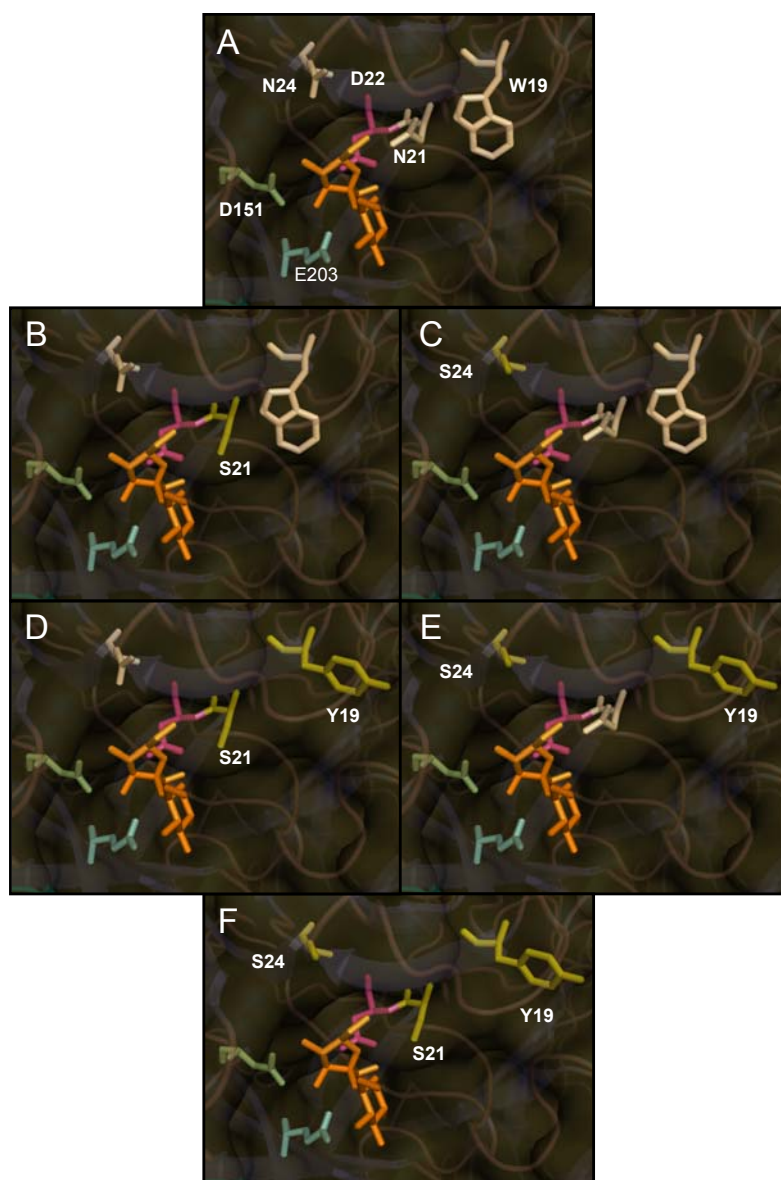


Figura 59. Vista ampliada del centro activo de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae* según el modelo estructural obtenido en este estudio. **A:** Suc2 nativa. Se señalan los residuos catalíticos (D22, D151 y E203), así como aquellos que se mutagenizaron (W19, N21 y N24). **B:** Suc2 N21S, **C:** Suc2 N24S, **D:** Suc2 W19Y/N21S, **E:** Suc2 W19Y/N24S y **F:** Suc2 W19Y/N21S/N24S. La localización de la molécula sustrato, en naranja, se obtuvo superponiendo las coordenadas de la estructura resuelta de una invertasa de *Arabidopsis thaliana* en complejo con sacarosa (PDB 2QQW).

Todos los transformantes con esta batería de enzimas mutantes sintetizaron la proteína heteróloga abundantemente de forma soluble (Figura 60). La enzima N21S mantuvo una actividad muy semejante a la wt pero en la doble mutante W19Y/N21S se redujo a la mitad. La mutación N24S comprometió más la actividad enzimática y este efecto se acentuó en los mutantes W19Y/N24S y W19Y/N21S/N24S (Tabla 27).

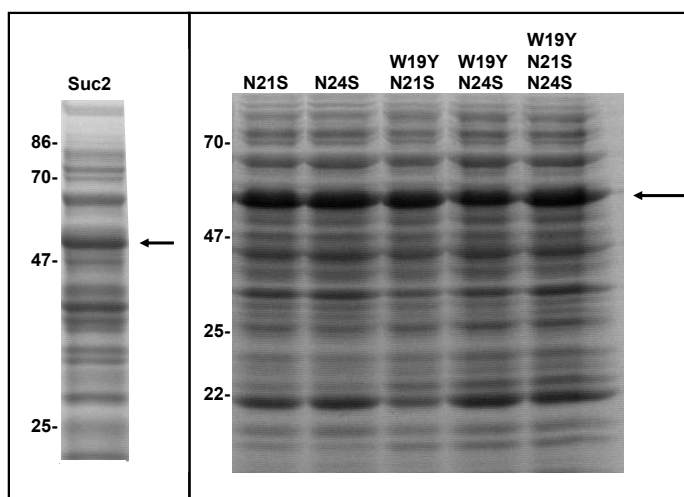


Figura 60. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de Suc2, Suc2 N21S, Suc2 N24S, Suc2 W19Y/N21S, Suc2 W19Y/N24S y Suc2 W19Y/N21S/N24S en *E. coli*. A la izquierda se indican los pesos moleculares (kDa). Las bandas que corresponderían con las proteínas de interés son las que señala la flecha.

Tanto la sustitución N21S como N24S incrementaron la síntesis de 6-kestosa en 6 veces. La combinación de N21S y W19Y tuvo un efecto sinérgico, aumentando la producción de 6-kestosa 10 veces en el mutante doble (W19Y/N21S) y triple (W19Y/N21S/N24S). En cambio, el fenotipo del doble mutante W19Y/N24S respecto a la síntesis de 6-kestosa fue muy similar al del mutante simple N24S (Figura 61). En todos los casos, la producción de 1-kestosa no se modificó respecto a la enzima wt. El incremento en la capacidad transfructosilante se vio reflejado también, como era de esperar, en un aumento del ratio Glc/Fru (Tabla 28).

Tabla 27. Actividad invertasa (μmol glucosa/(min·ml ex)) en el extracto soluble de los transformantes de la invertasa Suc2 nativa y de los mutantes medida a 50°C y pH 4.8 frente a sacarosa 1.75 M.

Activ. enzimática	
wt	2800
N21S	2600
N24S	440
W19Y/N21S	1400
W19Y/N24S	220
W19Y/N21S/N24S	44

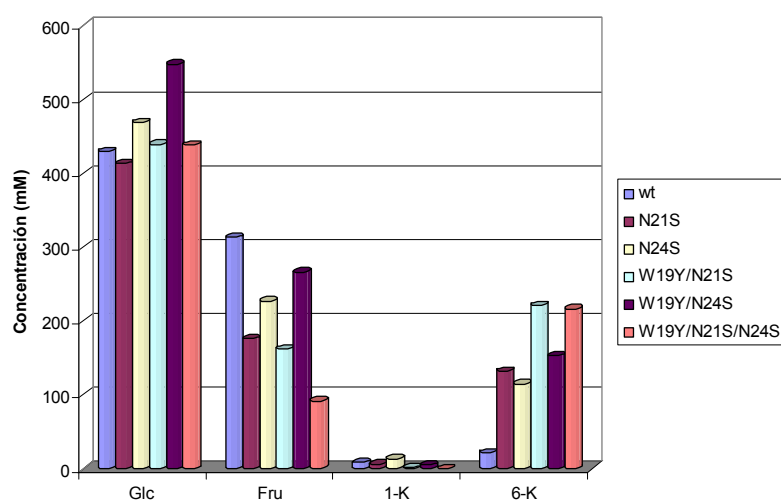


Figura 61. Producción de distintos azúcares tras la incubación de la enzima nativa y los mutantes Suc2 N21S, Suc2 N24S, Suc2 W19Y/N21S, Suc2 W19Y/N24S y Suc2 W19Y/N21S/N24S. La reacción se llevó a cabo incubando 0.15 U/ml de enzima junto con sacarosa a una concentración final de 1.75 M a un pH de 4.8 durante 24-48 h a 50°C. Glc: glucosa; Fru: fructosa; 1-K: 1-kestosa; 6-K: 6-kestosa.

Tabla 28. Porcentajes de producción de glucosa (Glc), fructosa (Fru), 1-kestosa (1-K) y 6-kestosa (6-K) respecto al total de azúcares. Se indica también el ratio molar glucosa/fructosa de la enzima Suc2 nativa (wt) y de las mutantes analizadas por Dionex.

	wt	N21S	N24S	W19Y/N21S	W19Y/N24S	W19Y/N21S/N24S
Glc	12,9	12,4	14,1	13,2	16,5	13,2
Fru	9,4	5,3	6,8	4,9	8,0	2,8
Glc/Fru	1,37	2,35	2,06	2,71	2,06	4,78
1-K	0,71	0,52	1,12	0,12	0,38	0,01
6-K	1,8	11,1	9,7	18,6	12,8	18,2

Modificación en el entorno del motivo EC

Como ya se ha comentado, el motivo EC contiene el residuo catalítico ácido-base en el mecanismo de reacción de las enzimas de la familia GH32. En el entorno de este motivo, las invertasas de la pared celular de plantas tienen una prolina en la secuencia WEC(P/V)D mientras que las fructosiltransferasas y las invertasas vacuolares presentan una valina, de acuerdo con su proximidad filogenética (Goetz y Roitsch 1999, Van den Ende et al. 2002) (Figura 62). Se ha observado que la sustitución de esta prolina por una valina en la invertasa extracelular CIN1 de *Chenopodium rubrum* aumenta el pH óptimo de la enzima acercándose al característico de invertasas vacuolares y modifica la especificidad de sustrato disminuyendo la degradación del trisacárido rafinosa respecto a la sacarosa (Goetz y Roitsch 1999). Nos propusimos estudiar el efecto de esta mutación (P205V) sobre la capacidad transfructosilante de Suc2. Asimismo, se diseñó la mutación triple W19Y/N21S/P205V para combinar los posibles efectos derivados de la modificación en el entorno del residuo ácido-base con los obtenidos para el mutante W19Y/N21S, en el entorno del residuo nucleófilo (Figura 63).

		P205V	
Suc2	201	QYEC P GLIEV	210
Inv (ex) <i>A. thaliana</i>	244	MWEC P DFFPV	253
Inv (ex) <i>D. carota</i>	245	MWEC P DFYPV	254
Inv (ex) <i>S. tuberosum</i>	244	NWEC P DFFPV	253
Inv (v) <i>A. thaliana</i>	287	MWEC V DFYPV	296
Inv (v) <i>D. carota</i>	321	MWEC V DFYPV	330
Inv (v) <i>S. tuberosum</i>	298	MWEC V DFYPV	307
1-SST <i>C. scolymus</i>	294	MWEC V DLYPV	303
1-SST <i>C. intybus</i>	297	MWEC V DLYPV	306
1-SST <i>A. cepa</i>	277	MLEC V DLYPV	286
6G-FFT/1-FFT <i>A. cepa</i>	265	MWEC V EVYPV	274
Consenso		** . *	

Figura 62. Alineamiento de la secuencia polipeptídica de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae* junto con diferentes invertasas extracelulares (ex), invertasas vacuolares (v) y transferasas de plantas. Invertasas extracelulares: *A. thaliana* (Q43866), *D. carota* (Q39693) y *S. tuberosum* (Q43171). Invertasas vacuolares: *A. thaliana* (Q7DLY6), *D. carota* (P80065) y *S. tuberosum* (Q43173). Transferasas: 1-SST *C. scolymus* (O23786-1), 1-SST *C. intybus* (O24459-1), 1-SST *A. cepa* (O81082-1) y 6G-FFT/1-FFT *A. cepa* (P92916-1). Está marcada con una flecha la mutación que se lleva a cabo.

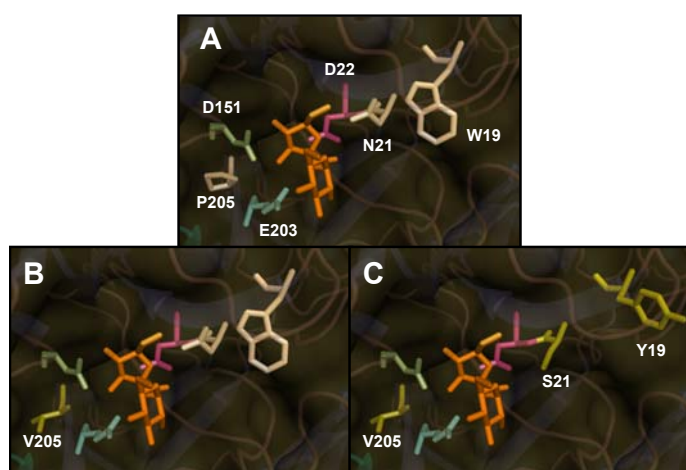


Figura 63. Vista ampliada del centro activo de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae* según el modelo estructural obtenido en este estudio. **A:** Suc2 nativa. Se señalan los residuos catalíticos (D22, D151 y E203), así como aquellos que se van mutagenizaron (W19, N21 y P205). **B:** Suc2 P205V, **C:** Suc2 W19Y/N21S/P205V. La localización de la molécula sustrato, en naranja, se obtuvo superponiendo las coordenadas de la estructura resuelta de una invertasa de *Arabidopsis thaliana* en complejo con sacarosa (PDB 2QQW).

Ambos transformantes sintetizaron las proteínas mutantes P205V y W19Y/N21S/P205V de forma soluble y abundante (Figura 64). La enzima P205V mantuvo una actividad total comparable a la de la enzima wt mientras que la W19Y/N21S/P205V mostró una reducción de actividad de más de 30 veces (Tabla 29).

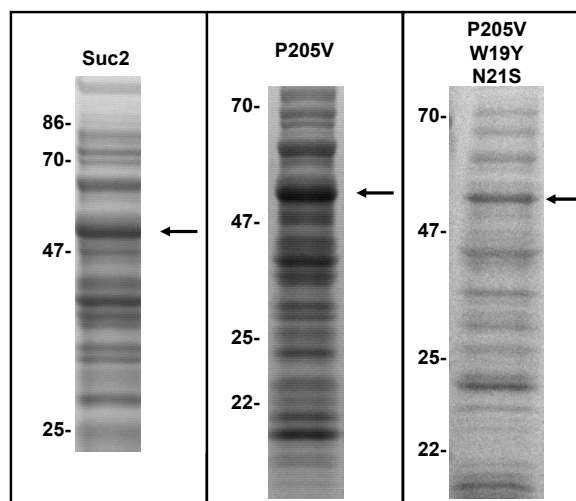


Figura 64. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de Suc2, Suc2 P205V y Suc2 W19Y/N21S/P205V en *E. coli*. A la izquierda se indican los pesos moleculares (kDa). Las bandas que corresponderían con las proteínas de interés son las que señalan las flechas.

Tabla 29. Actividad invertasa (μmol glucosa/(min·ml ex)) en el extracto soluble de los transformantes de la invertasa Suc2 nativa y de los mutantes medida a 50°C y pH 4.8 frente a sacarosa 1.75 M.

Activ. enzimática	
wt	2800
P205V	3400
P205V/W19Y/N21S	85

El mutante P205V presentó una mayor transfructosilación que la enzima nativa Suc2 sintetizando 5 veces más 6-kestosa para la misma producción de glucosa. El mutante W19Y/N21S/P205V mostró una mayor capacidad transfructosilante que el mutante simple P205V, pero no mejoró la producción de 6-kestosa del mutante W19Y/N21S (Figura 65). De nuevo, el aumento en la capacidad de sintetizar FOS se correlacionó con un mayor ratio Glc/Fru. Al igual que en el caso de las mutaciones en el entorno del residuo nucleófilo, la mutación P205V provocó un incremento específico de la producción de 6-kestosa sin afectar a la síntesis de 1-kestosa (Tabla 30).

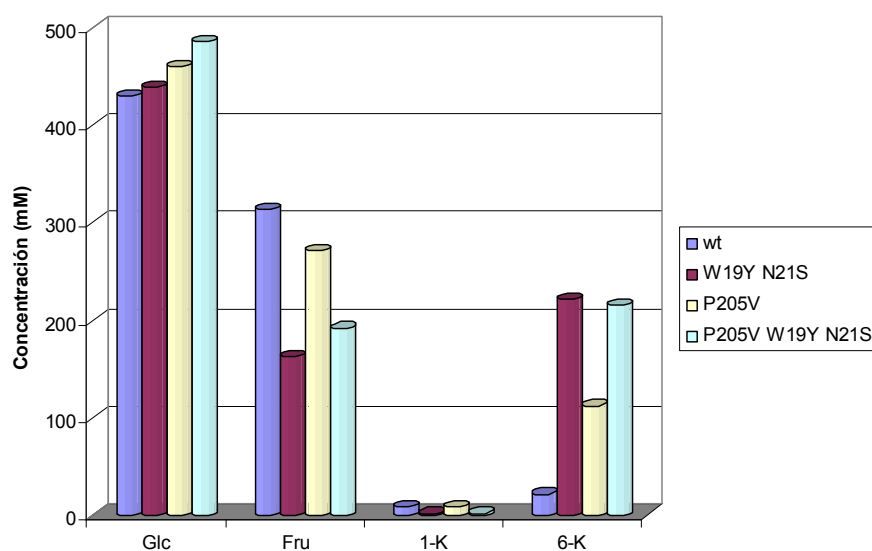


Figura 65. Producción de distintos azúcares tras la incubación de la enzima nativa y los mutantes Suc2-W19Y/N21S, Suc2-P205V y Suc2-P205V/W19Y/N21S. La reacción se llevó a cabo incubando 0.15 U/ml de enzima junto con sacarosa a una concentración final de 1.75 M a un pH de 4.8 durante 24-48 h a 50°C. Glc: glucosa; Fru: fructosa; 1-K: 1-kestosa; 6-K: 6-kestosa.

Tabla 30. Porcentajes de producción de glucosa (Glc), fructosa (Fru), 1-kestosa (1-K) y 6-kestosa (6-K) respecto al total de azúcares. Se indica también el ratio molar glucosa/fructosa de la enzima Suc2 nativa (wt) y de las mutantes analizadas por Dionex.

	wt	W19Y/N21S	P205V	P205V/W19Y/N21S
Glc	12,9	13,2	13,8	14,6
Fru	9,4	4,9	8,2	5,8
Glc/Fru	1,37	2,71	1,70	2,53
1-K	0,71	0,12	0,72	0,16
6-K	1,8	18,6	9,4	18,1

Modificación del sitio de unión a la sacarosa como aceptor del grupo fructosilo

Mediante análisis de acoplamiento “docking” se estudió el modo de interacción de la 6-kestosa (el principal producto de transfructosilación de Suc2) con los residuos del centro activo de la invertasa de *S. cerevisiae*. Este complejo enzima-6-kestosa se podría considerar una aproximación al estado de transición en el mecanismo de reacción de la invertasa en el que la sacarosa entraría como aceptor del grupo fructosilo. Es decir, la interacción de la 6-kestosa con los sitios +1 y +2 podría aproximarse al modo de unión de la sacarosa como grupo aceptor. El único residuo que interaccionaría con el grupo glucosilo de la 6-kestosa es la Asn228, por lo que podría estar involucrado tanto en la afinidad de unión a la sacarosa, afectando a la capacidad de transfructosilación, como en la orientación de la sacarosa en el centro activo influenciando en la especificidad del producto sintetizado (Figura 66).

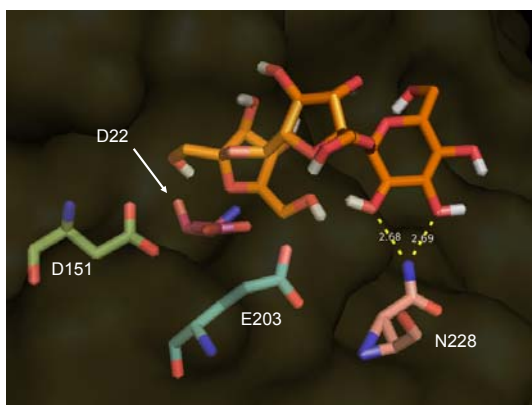


Figura 66. Acoplamiento “docking” del modelo estructural de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae* con el trisacárido 6-kestosa (coloreada en naranja). Están señalados los residuos catalíticos (D22, D151 y E203) así como la asparagina 228, el único residuo que establecería contactos polares con el grupo glucosilo de la 6-kestosa. Los átomos de oxígeno se señalan en rojo, los de nitrógeno en azul y los de hidrógeno en blanco. Las interacciones polares se señalan con líneas discontinuas amarillas indicando las distancias entre los átomos involucrados.

Con el propósito de estudiar el papel de este residuo en la reacción de transfructosilación de Suc2 mutamos la Asn228 a una arginina así como a una alanina. Ya que la Suc2 nativa no tiene una gran capacidad transfructosilante, también realizamos estas mismas mutaciones sobre uno de los mutantes con mayor producción de 6-kestosa, el Suc2 N21S, con el objeto de analizar cómo afecta esta combinación en el perfil de FOS sintetizados. En la Figura 67 se puede observar el modelo de la invertasa nativa y los cuatro mutantes.

Todas las proteínas mutantes se sintetizaron en forma soluble con buen rendimiento (Figura 68). La enzima N228R mostró una actividad total inferior respecto a la nativa, mientras que la N228A fue del mismo orden. La incorporación de la mutación N21S causó una reducción de la actividad con respecto a las mutaciones simples (Tabla 31).

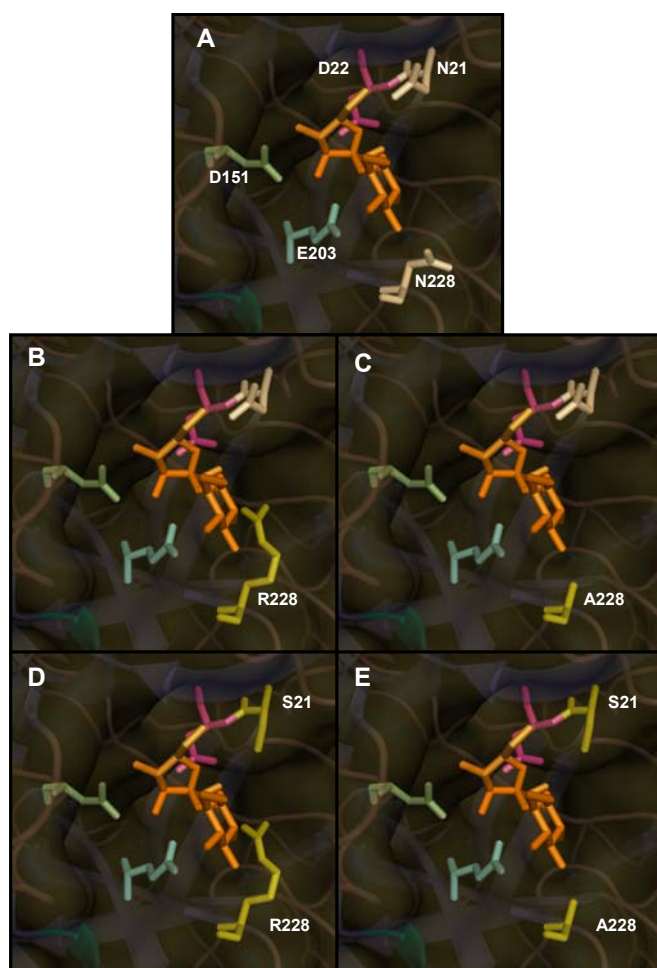


Figura 67. Vista ampliada del centro activo de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae* según el modelo estructural obtenido en este estudio. **A:** Suc2 nativa. Se señalan los residuos catalíticos (D22, D151 y E203), así como aquellos que se mutagenizaron (N21 y N228). **B:** Suc2 N228R, **C:** Suc2 N228A, **D:** Suc2 N21S/N228R y **E:** N21S/N228A. La localización de la molécula sustrato, en naranja, se obtuvo superponiendo las coordenadas de la estructura resuelta de una invertasa de *Arabidopsis thaliana* en complejo con sacarosa (PDB 2QQW).

Tanto las mutaciones N228R como N21S/N228R inhibieron completamente la síntesis de 6-kestosa, hecho que apoya la importancia de este residuo en la transfructosilación. La mutación N228A no afectó de una

forma importante por sí sola a la capacidad transfructosilante o al patrón de FOS sintetizados con respecto al wt. Sin embargo, cuando se combinó con la mutación N21S se observaron cambios sustanciales. Mientras que el mutante N21S produjo mayoritariamente 6-kestosa, el N21S/N228A sintetizó cantidades de 1-kestosa y 6-kestosa equimolares (Figura 69). En la Tabla 32 se muestran los porcentajes de producción de los diferentes azúcares respecto al total de sacarosa inicial.

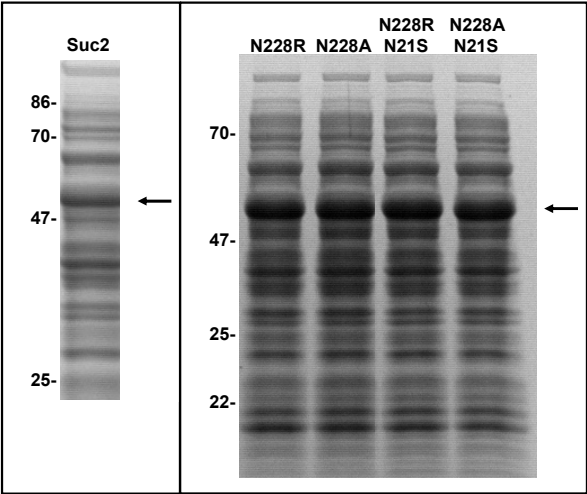


Figura 68. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de Suc2, Suc2 N228R, Suc2 N228A, Suc2 N228R/N21S y Suc2 N228A/N21S en *E. coli*. A la izquierda se indican los pesos moleculares (kDa). Las bandas que corresponderían con las proteínas de interés son las que señalan la flecha.

Tabla 31. Actividad invertasa ($\mu\text{mol glucosa}/(\text{min}\cdot\text{ml ex})$) en el extracto soluble de los transformantes de la invertasa Suc2 nativa y de los mutantes medida a 50°C y pH 4.8 frente a sacarosa 1.75 M.

Activ. enzimática	
wt	2800
N228R	660
N228A	4200
N228R/N21S	120
N228A/N21S	560

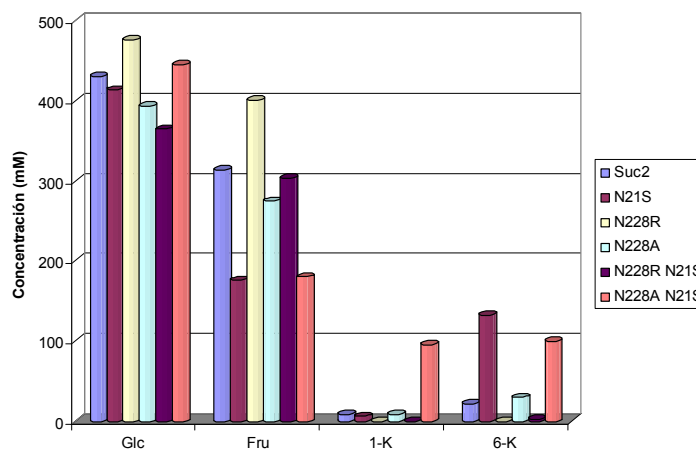


Figura 69. Producción de distintos azúcares tras la incubación de la enzima nativa y los mutantes Suc2-N21S, Suc2-N228R, Suc2-N228A, Suc2-N228R/N21S y Suc2-N228A/N21S. La reacción se llevó a cabo incubando 0.15 U/ml de enzima junto con sacarosa a una concentración final de 1.75 M a un pH de 4.8 durante 24-48 h a 50°C. Glc: glucosa; Fru: fructosa; 1-K: 1-kestosa; 6-K: 6-kestosa.

Tabla 32. Porcentajes de producción de glucosa (Glc), fructosa (Fru), 1-kestosa (1-K) y 6-kestosa (6-K) respecto al total de azúcares. Se indica también el ratio molar glucosa/fructosa de la enzima Suc2 nativa (wt) y de las mutantes analizadas por Dionex.

	Suc2	N21S	N228R	N228A	N228R/N21S	N228A/N21S
Glc	12,9	12,4	14,3	11,8	10,9	13,4
Fru	9,4	5,3	12,0	8,3	9,1	5,4
Glc/Fru	1,37	2,35	1,19	1,43	1,20	2,47
1-K	0,71	0,52	0	0,74	0	8,01
6-K	1,8	11,1	0	2,5	0,2	8,4

Comparación global de todos los mutantes

En la Tabla 33 se muestra la comparación de todos los mutantes analizados en este estudio. Los mutantes con un mayor ratio Glc/Fru fueron el W19Y/N21S, el W19Y/N21S/N24S, el P205V/W19Y/N21S y el N228A/N21S, si bien la actividad específica en los dos triples mutantes se redujo hasta menos del 3% de la enzima wt. Excepto en el caso del mutante N228A/N21S, e independientemente de la capacidad de transfructosilación de cada una de las variantes analizadas, el producto de transfructosilación mayoritario fue la 6-kestosa.

Tabla 33. Comparativa entre la invertasa Suc2 wt y los mutantes realizados en este trabajo en relación a la actividad específica, el ratio molar glucosa/fructosa y el porcentaje de producción de 1-kestosa y 6-kestosa respecto al total de azúcares de la mezcla.

	Actividad μmol Glc/(min·mlex)	Ratio Glc/Fru	% Produc 1-K	% Produc 6-K
wt	2800	1,37	0,71	1,8
GVW	2200	1,33	0,17	1,4
VVV	26	1,60	1,18	6,2
W19Y	4700	1,35	0,29	2,4
N21S	2600	2,35	0,52	11,1
N24S	440	2,06	1,12	9,7
W19Y/N21S	1400	2,71	0,12	18,6
W19Y/N24S	220	2,06	0,38	12,8
W19Y/N21S/N24S	44	4,78	0,01	18,2
W287Y	96	1,39	0,39	2,4
W291Y	860	1,42	0,47	4,2
F82W	2300	1,24	0	0,7
P205V	3400	1,70	0,72	9,4
N228R	660	1,19	0	0
N228A	4200	1,43	0,74	2,5
P205V/W19Y/N21S	85	2,53	0,16	18,1
N228R/N21S	120	1,20	0	0,2
N228A/N21S	560	2,47	8,01	8,4

2.7 Optimización de las condiciones de temperatura y pH de la reacción transfructosilante

Una vez seleccionados los mutantes que podrían ser los candidatos para su aplicación a escala industrial en la producción de FOS, se hace necesaria una optimización de las condiciones de temperatura y pH durante la reacción enzimática con el propósito de alcanzar la mayor producción del compuesto de interés.

Para este estudio seleccionamos la invertasa wt Suc2 de *S. cerevisiae* así como dos mutantes, el W19Y/N21S y el P205V. El ensayo para analizar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se realizó a pH 4.8 a tres temperaturas diferentes 40, 50 y 60°C (Figura 70). Tanto la enzima nativa como las dos mutantes mostraron un aumento progresivo en la liberación de glucosa con el incremento de temperatura indicando un aumento de la actividad global de la enzima. Sin embargo, la dependencia con la temperatura de las reacciones de hidrólisis y transfructosilación de las tres enzimas fue diferente. En la enzima wt y especialmente en el mutante P205V, tanto la producción relativa de 6-kestosa como los ratios Glc/Fru fueron mayores al incrementar la temperatura. En cambio, con el mutante W19Y/N21S no se observó un incremento preferencial de la actividad transfructosilante respecto a la hidrolítica al aumentar la temperatura (Tabla 34).

Tabla 34 Comparativa entre la invertasa Suc2 wt de *S. cerevisiae* y los mutantes W19Y/N21S y P205V en relación al ratio Glucosa/Fructosa y al porcentaje de producción de 6-kestosa en función de la temperatura utilizada en la reacción.

		40°C	50°C	60°C
Suc2 wt	Glc/Fru	1,25	1,28	1,28
	% 6-K	0,7	1,5	2,2
W19Y N21S	Glc/Fru	3,08	2,59	2,47
	% 6-K	11,1	12,5	13,0
P205V	Glc/Fru	1,49	1,59	1,72
	% 6-K	2,8	4,5	6,4

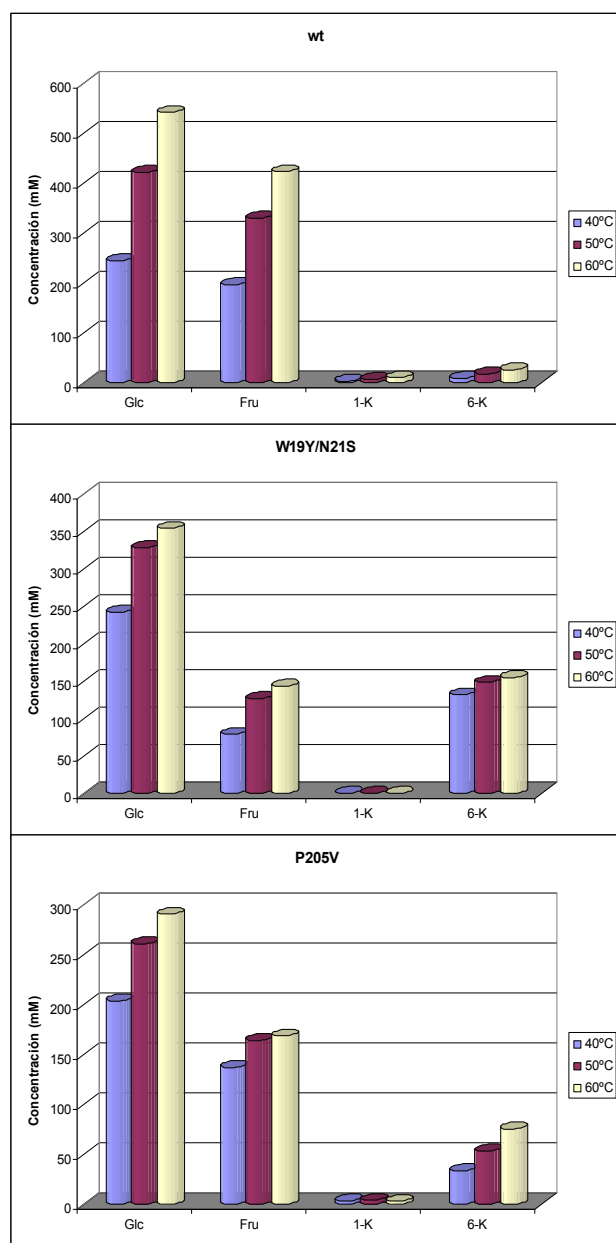


Figura 70. Producción de distintos azúcares tras la incubación de 0.15 U/ml de la enzima nativa y los mutantes W19Y/N21S y P205V con sacarosa (1.75 M) en tampón acetato durante 24 h a tres temperaturas 40, 50 y 60°C. Glc: glucosa; Fru: fructosa; 1-K: 1-kestosa; 6-K: 6-kestosa.

El ensayo que se realizó para analizar el efecto del pH sobre la actividad enzimática se llevó a cabo a 50°C a tres pH diferentes, 3.8, 4.8 y 5.7 (Figura 71). Suc2 wt mostró una actividad global (liberación de glucosa) mayor a pH 3.8 mientras que sintetizó ligeramente más 6-kestosa a pH más básicos (Figura 71 y Tabla 35). Ambos mutantes presentaron un desplazamiento del pH óptimo hacia valores más básicos, tanto para la actividad global como para la síntesis de FOS, aunque los ratios Glc/Fru indicaron que el aumento del pH incrementa la actividad transfructosilante en mayor grado que la hidrolítica (Figura 71 y Tabla 35).

Tabla 35. Comparativa entre la invertasa Suc2 wt de *S. cerevisiae* y los mutantes W19Y/N21S y P205V en relación al ratio Glucosa/Fructosa y al porcentaje de producción de 6-kestosa en función del pH utilizado en la reacción.

		3,8	4,8	5,7
Suc2 wt	Glc/Fru	1,26	1,32	1,34
	% 6-K	1,0	2,0	1,5
W19Y N21S	Glc/Fru	1,77	3,22	3,52
	% 6-K	4,8	13,5	13,4
P205V	Glc/Fru	1,23	1,69	1,84
	% 6-K	0,2	6,1	6,4

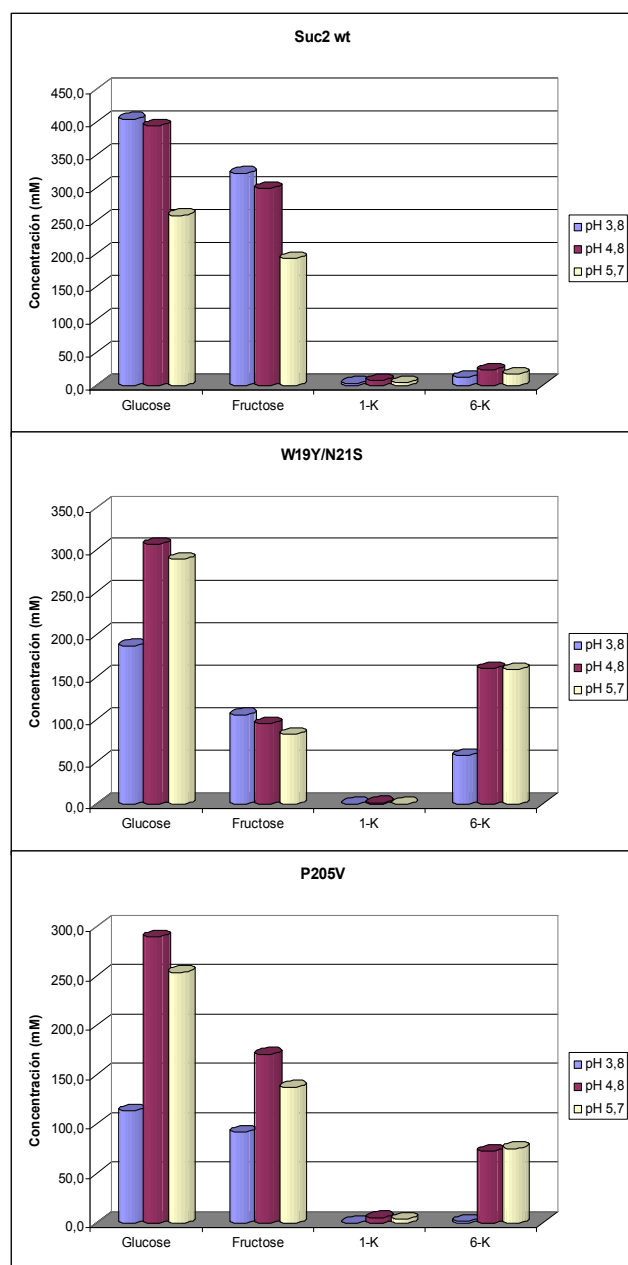


Figura 71. Producción de distintos azúcares tras la incubación de 0.15 U/ml de la enzima nativa y los mutantes W19Y/N21S y P205V con sacarosa (1.75 M) durante 24 h en tampón acetato con tres pH 3.8, 4.8 y 5.7. Glc: glucosa; Fru: fructosa; 1-K: 1-kestosa; 6-K: 6-kestosa.

2.8 Análisis cinético de los mutantes con mejores propiedades de transfructosilación

Cálculo de las constantes cinéticas para la actividad global de las enzimas.

Para evaluar en detalle el efecto de las mutaciones en el motivo WMNDPNG sobre las propiedades catalíticas de Suc2 se determinaron los valores de K_m (constante de Michaelis) y k_{cat} (constante catalítica) para la enzima silvestre y una selección de mutantes. La invertasa de *S. cerevisiae*, según estudios previos, sigue básicamente un comportamiento de Michaelis-Menten pero sufre inhibición por sustrato (sacarosa), e inhibición por producto (glucosa y fructosa) (Combes y Monsan 1983). Para desprestigiar el efecto de esta última en la medida de velocidades iniciales, se tomó la precaución de no dejar progresar la reacción más allá de la síntesis de 15 mM de glucosa. Al incrementar la concentración de sustrato la actividad de Suc2 aumentó progresivamente y sólo se observó una ligera disminución por encima de 1 M de sacarosa (Figura 72). Este resultado sugiere que en las condiciones utilizadas en este trabajo la inhibición por sustrato no es demasiado importante, y contrasta con resultados previos en los que la actividad de Suc2 desciende bruscamente por encima de 200 mM de sacarosa alcanzando el 50% de actividad máxima a 1 M de sacarosa (Combes y Monsan 1983). Esta diferencia podría explicarse por la diferencia de temperatura de los dos ensayos (50°C en el presente trabajo vs 25°C en el experimento previo). Los mutantes N21S, N24S y W19Y/N21S siguieron también una cinética tipo Michaelis-Menten, mostrando cierta inhibición por sustrato a concentraciones de sacarosa superiores a 1 M en el caso de N24S (Figura 72). Los datos de actividad hasta concentraciones de sustrato 1 M (wt y N24S) y 1.5 M (N21S y W19Y/N21S) se seleccionaron para la determinación de las constantes cinéticas K_m y k_{cat} (Figura 72). Los valores obtenidos (Tabla 36) indican que la mutación N21S ocasiona una pérdida importante de la afinidad por sustrato, al observarse un aumento de K_m de unas 30 veces, mientras que la k_{cat} no se modificó significativamente. Por el contrario, el mutante N24S presentó una k_{cat} unas 10 veces menor que la enzima silvestre, con una K_m similar. El doble mutante W19Y/N21S mostró propiedades catalíticas semejantes al mutante simple N21S.

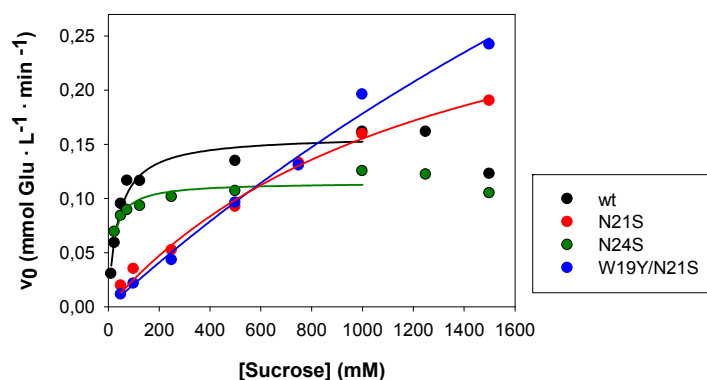


Figura 72. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la velocidad inicial (v_0) de reacción de la invertasa wt y los mutantes a 50°C y pH 4.8. Las concentraciones de enzima fueron 0.77 nM (wt), 1.50 nM (N21S), 5.3 nM (N24S) y 5.6 nM (W19Y/N21S) y se calcularon utilizando el peso molecular esperado para un monómero de Suc2 (58.54 kDa). El ajuste (línea continua) de la ecuación de Michaelis-Menten a los datos experimentales se llevó a cabo mediante cálculo numérico utilizando el programa Sigma-Plot.

Tabla 36. Valores de k_{cat} y K_m de la invertasa wt y los mutantes.

	k_{cat} (S ⁻¹)	K_m (mM)
wt	3430 ± 170	38 ± 7
N21S	4000 ± 500	1300 ± 300
N24S	360 ± 15	19 ± 5
W19Y/N21S	3300 ± 1500	5000 ± 3000

Cinética de síntesis y degradación de FOS

Los mutantes N21S, N24S, W19Y/N21S y W19Y/N21S/N24S se seleccionaron para estudiar la cinética de síntesis y degradación de 6-kestosa, el producto de transfructosilación predominante para todos ellos. Se emplearon las mismas unidades de enzima en todos los casos, calculando previamente la actividad global inicial en las mismas condiciones que para el

ensayo de transfructosilación. La cinética de liberación de glucosa fue similar para todos los mutantes, a excepción del N24S, que acumuló más glucosa a tiempos largos de incubación (Figura 73A), probablemente debido a que éste presenta una mayor afinidad por el sustrato que el resto de mutantes. La cinética de síntesis y degradación de 6-kestosa fue distinta en los diferentes mutantes. Tanto N21S como N24S llegaron a sintetizar 6-kestosa hasta un máximo de 250 y 210 mM, respectivamente, tras unas 24 horas de incubación. Sin embargo, mientras que en el caso de N24S la 6-kestosa se degradó completamente después de 48 h más (vida media de 15 h), con la enzima N21S el producto de transfructosilación fue más estable (vida media de 80 h) (Figura 73B). Esta acentuada hidrólisis de 6-kestosa con el mutante N24S parece estar relacionada con la mayor actividad global de esta enzima a tiempos largos de incubación (Figura 73A). Con las enzimas W19Y/N21S y W19Y/N21S/N24S se llegó a sintetizar 6-kestosa hasta una concentración de 370 mM tras 24 horas de incubación, y la vida media de la misma fue de 60 h.

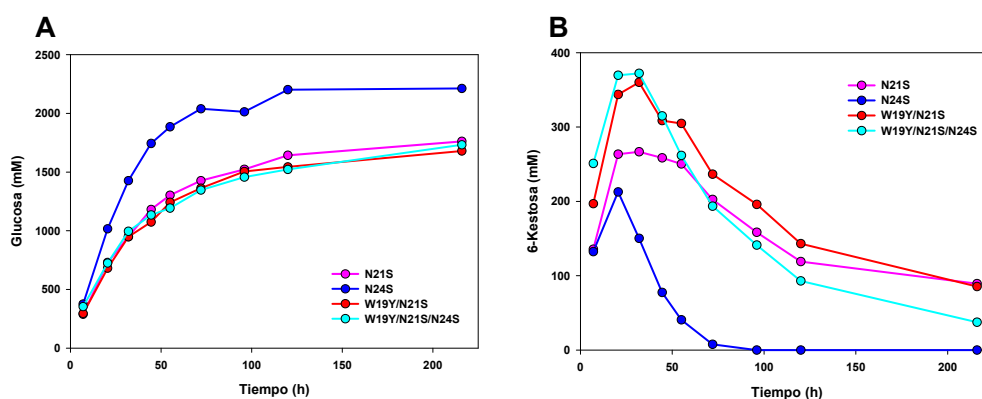


Figura 73. Cinética de liberación de glucosa (A) y de síntesis-degradación de FOS (B) por la invertasa Suc2 y los mutantes seleccionados. Se incubaron 0.6 U/ml de cada una de las enzimas con sacarosa 2.25 M a 50°C y pH 4.8.

DISCUSIÓN

1 CARACTERIZACIÓN DE *Wickerhamomyces onychis* Y *Wickerhamomyces navarrensensis* sp. nov.

La taxonomía clásica de levaduras se basa en criterios arbitrarios, los cuales han ido renovándose a lo largo del tiempo conforme han ido avanzando las técnicas experimentales (Fonseca et al. 2008). En la actualidad se utilizan métodos moleculares para la identificación de levaduras mediante comparación de secuencias, siendo la técnica más habitual la amplificación y secuenciación del dominio D1/D2 del gen 26S o las regiones ITS (internal transcribed spacer) del DNA ribosomal (rDNA) (Figura 74) (Belloch et al. 2002, Bhadra et al. 2008, Chen et al. 2000, Kurtzman et al. 2008, Kurtzman y Robnett 1997, Kurtzman y Robnett 1998). A partir de amplificaciones sucesivas, secuenciaciones y ensamblajes, se obtuvieron en el presente trabajo las secuencias del DNA ribosomal de *W. navarrensensis* y *W. onychis* desde el gen18S hasta el 26S, incluyendo por tanto las secuencias ITS1, ITS2 y la región del dominio D1/D2. Las secuencias de los genes 18S, 5.8S, y 26S del rDNA nuclear evolucionan lentamente y están relativamente conservadas entre hongos y levaduras, de modo que se pueden utilizar para establecer relaciones filogenéticas entre ellas (Chen et al. 2000). Las secuencias ITS1 e ITS2 evolucionan más rápidamente y por lo tanto varían entre especies filogenéticamente próximas.

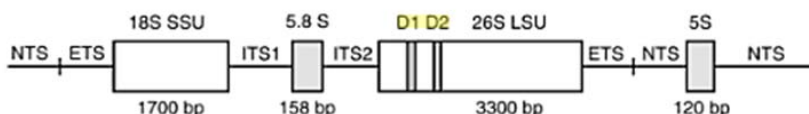


Figura 74. Estructura del DNA ribosomal nuclear.

El grado de variabilidad de la región D2 del DNA ribosomal 26S en diversas levaduras heterotáticas ascomicetas se ha correlacionado con la capacidad de generar cruces genéticos fértiles (Peterson y Kurtzman 1991). De esta manera el concepto clásico de especie biológica se ha conectado con el concepto filogenético molecular de especie. Estudiando diversas especies de los géneros *Pichia*, *Issatchenkia* y *Saccharomyces* se concluyó que cepas de la misma especie biológica generalmente muestran menos de

un 1% de sustituciones en la región D2 (3 sustituciones en 300 nucleótidos) (Peterson y Kurtzman 1991). Comparando 500 especies de levaduras ascomicetas se determinó que miembros de la misma especie presentan sustituciones de hasta 3 nucleótidos en los alrededor de 600 nucleótidos de la región variable D1/D2 del DNA ribosomal y aquellas de diferente especie tienen más de un 1% de sustituciones (6 nucleótidos) (Kurtzman y Robnett 1997, Kurtzman y Robnett 1998). En base a estos estudios se ha establecido como criterio molecular para la discriminación filogenética que cepas de levaduras que pertenecen a distintas especies difieren en más de un 1% en el dominio D1/D2 del gen 26S del DNA ribosomal. En esta región *W. navarrensis* y *W. onychis* presentan un 1.1% de divergencia de secuencia (7 sustituciones nucleotídicas) sugiriendo que se trata de especies distintas.

Por otro lado, comparando las secuencias ITS obtenidas de ambas levaduras se observó que había una diferencia considerable tanto en la ITS1 como en la ITS2. Según la bibliografía, basándose en múltiples comparaciones de secuencia del DNA ribosomal de multitud de microorganismos eucariotas, se ha determinado que levaduras de diferente especie normalmente presentan más del 1% de sustituciones en toda la región ITS (Wang et al. 2008). En nuestro caso, *W. navarrensis* y *W. onychis* difieren en un 2.75%. También se ha observado que especies diferentes contienen regiones ITS2 con menos de un 99% de homología (Chen et al. 2000). En esta región *W. navarrensis* tiene una homología del 98.05% con *W. onychis*.

En vista del conjunto de resultados obtenidos a nivel molecular se puede considerar que *W. navarrensis* a pesar de estar muy próxima a nivel filogenético de *W. onychis*, representa una nueva especie de levadura. El género *Wickerhamomyces* surgió a partir de una nueva reclasificación filogenética analizando las secuencias 26S, 18S y EF1- α de 140 taxones. De este estudio se concluyó que un grupo de especies del género *Pichia* deberían clasificarse dentro del género *Wickerhamomyces*, como es el caso de *Pichia onychis* (actual *W. onychis*) y probablemente también *W. navarrensis* debido a su proximidad filogenética (Kurtzman et al. 2008).

En la base de datos del GenBank existen diversas secuencias de la región D1/D2 asignadas a *W. onychis*. Sin embargo, estas secuencias presentan diferencias significativas (Figura 75) que deberían replantear su clasificación filogenética basándonos en las pautas que aparecen en la bibliografía acerca de la clasificación taxonómica de levaduras (Chen et al.

2000, Daniel y Meyer 2003, James et al. 2009, Kurtzman y Robnett 1997, Kurtzman y Robnett 1998, Peterson y Kurtzman 1991, Wang et al. 2008). Tomando como referencia la secuencia EU877914.1 obtenida en este estudio, proveniente de la levadura *W. onychis* depositada en la CECT, las secuencias del dominio D1/D2 EF550279, U75421, EU809437, EU809450, EU326113 y EU719334 pertenecerían efectivamente a la misma especie ya que presentan menos de 3 sustituciones nucleotídicas (Tabla 37). Sin embargo, las secuencias EF643575, EU285528 y EU188618 deberían clasificarse como especies diferentes a *W. onychis* ya que su homología es menor al 99%. La secuencia EF643575 podría corresponder a una especie hermana o cepa coespecífica de *W. navarrensis* ya que solamente se diferencian en un nucleótido.

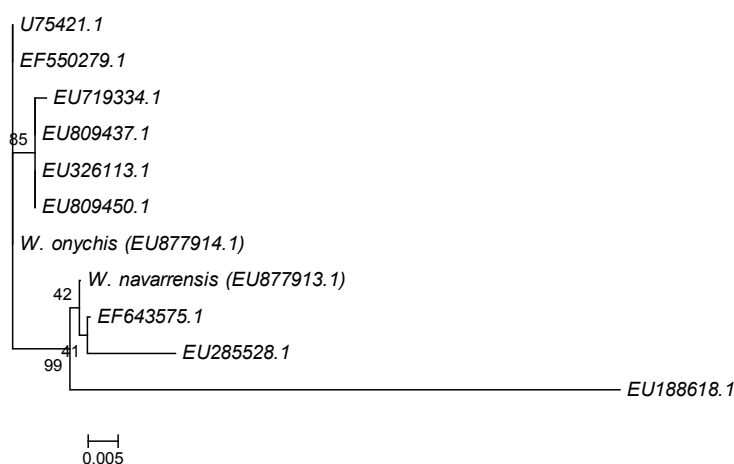


Figura 75. Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias del dominio D1/D2 de cepas de levadura clasificadas como *W. onychis* en el GenBank junto con las de *W. navarrensis* (EU877913.1) y *W. onychis* (EU877914.1) obtenidas en este trabajo, construido con el método "BIONJ neighbour-joining" y "Kimura's two-parameter" como modelo. Las cifras en los nodos representan los porcentajes de "bootstrap" de 1000 réplicas. La barra de escala representa 0.005 sustituciones por posición de base.

Tabla 37. Relación entre secuencias del dominio D1/D2 de cepas de levadura clasificadas como *W. onychis* en el GenBank junto con la de *W. navarrensis* (EU877913.1) en relación a la secuencia D1/D2 de *W. onychis* (EU877914.1) obtenidas en este trabajo.

	Tamaño	Nº nucleot. diferentes	% Homología	Nº inserc./delecc.	Relación
<i>W. onychis</i>	543				
EF550279	543	0	100	0	Misma especie
U75421	543	0	100	0	Misma especie
EU809437	543	2	99.63	0	Misma especie
EU809450	543	2	99.63	0	Misma especie
EU326113	543	2	99.63	0	Misma especie
EU719334	542	3	99.44	1	Misma especie
<i>W. navarrensis</i>	540	6	98.89	3	Especie diferente
EF643575	539	7	98.71	3	Especie diferente
EU285528	535	14	97.42	6	Especie diferente
EU188618	540	51	90.61	6	Especie diferente

En el estudio cromosómico de ambas levaduras *W. navarrensis* presentó un cariotipo homogéneo mientras que *W. onychis* mostró un alto nivel de polimorfismo (Figura 27). Estos resultados se asemejan a los observados en algunas especies de *Pichia* y *Candida* filogenéticamente cercanas (Muller et al. 2009, Wu et al. 2006) y sugiere que el polimorfismo cromosómico observado entre colonias de *W. onychis* se podría deber a procesos de pérdida cromosómica o reorganizaciones genéticas como traslocaciones o inversiones (Chu et al. 1993, Dover et al. 1982, Espinosa 2006, Link y Olson 1991). Esta heterogeneidad se refleja también a nivel microscópico ya que se observó que las células de *W. onychis* eran polimorfas (Figura 31).

Como se ha apuntado anteriormente, los métodos tradicionales para identificar levaduras se basan en diferencias fenotípicas como pueden ser la capacidad para esporular, morfología colonial y celular, así como en ensayos de asimilación o fermentación de compuestos carbonados. La capacidad de

utilización de ciertos compuestos orgánicos como única fuente de carbono en condiciones aerobias es una de las pruebas más utilizadas para la identificación de levaduras a nivel clínico e industrial. Los compuestos carbonados que se utilizan habitualmente son azúcares, ácidos orgánicos y algunos azúcares alcohol. Los resultados obtenidos en el presente estudio revelaron diferencias tanto en el patrón de asimilación de azúcares como en el de actividades enzimáticas (Tablas 20 y 21).

La búsqueda de nuevas enzimas se está extendiendo a muchos campos de la ciencia, tanto en investigación básica como aplicada. Para ello, una de las principales estrategias es el rastreo de nichos ecológicos de particular interés para identificar nuevos microorganismos. En este estudio se utilizaron muestras de tierra asociada a raíces de ajo y cebolla, ricas en sacarosa e inulina, en busca de microorganismos con actividades invertasa y/o inulinasa. La nueva levadura caracterizada en el presente estudio, *W. navarrensis*, no presentó actividad inulinasa pero sí invertasa. Esta actividad es debida a que *W. navarrensis* está dotada de un gen que codifica una invertasa perteneciente a la familia GH32, que también presenta cierta capacidad transfructosilante.

2 ANÁLISIS BIOQUÍMICO E INGENIERÍA MOLECULAR DE LA INVERTASA *Suc2* DE *S. cerevisiae*

2.1 Análisis estructural de la invertasa *Suc2* de *S. cerevisiae*

El modelado de la invertasa de *S. cerevisiae* permite, además de evaluar el plegamiento global de la proteína, inspeccionar las propiedades estructurales del centro activo. Como ya se ha comentado anteriormente, la secuencia de la invertasa de *S. cerevisiae* contiene la característica “tríada catalítica” de las enzimas de la familia GH32, constituida por el aspártico nucleófilo (Asp22), el glutámico ácido/base (Glu203) y el aspártico que actúa como estabilizador del estado de transición (Asp151). Se superpuso el modelo estructural realizado de la enzima *Suc2* a dos estructuras resueltas de enzimas de la familia GH32, la invertasa de *A. thaliana* (2AC1) y la fructosiltransferasa de *A. japonicus* (3LF7) con un grado de identidad de secuencia respecto a *Suc2* del 18% y 16% respectivamente. El alto grado de conservación de la orientación y posición de los residuos catalíticos de *Suc2*

con respecto a otras enzimas con alta divergencia de secuencia apoyan la elevada precisión y calidad del modelo (Figura 76A). La unión del sustrato (sacarosa) al centro catalítico está estabilizada por una red de puentes de H con los residuos del centro activo y por la interacción con una zona hidrofóbica. El sitio de unión al sustrato se subdivide en un subsitio -1 (zona de unión al grupo fructosilo) y un subsitio +1 (que une el grupo glucosilo), según la nomenclatura de Davies et al. (1997). Según el modelo, forman parte del subsitio -1 además de los residuos de la tríada catalítica, los residuos Trp291, Gln40, Ser83, Arg150 y Asn21. En el subsitio +1 se localizarían los residuos Trp291, Asn228, Gln201 y Glu203 (ácido-base) (Figura 76B). Los equivalentes a la mayoría de estos residuos forman puentes de H con el sustrato en estructuras resueltas de *T. maritima*, *A. thaliana* y *C. intybus* (Tabla 38).

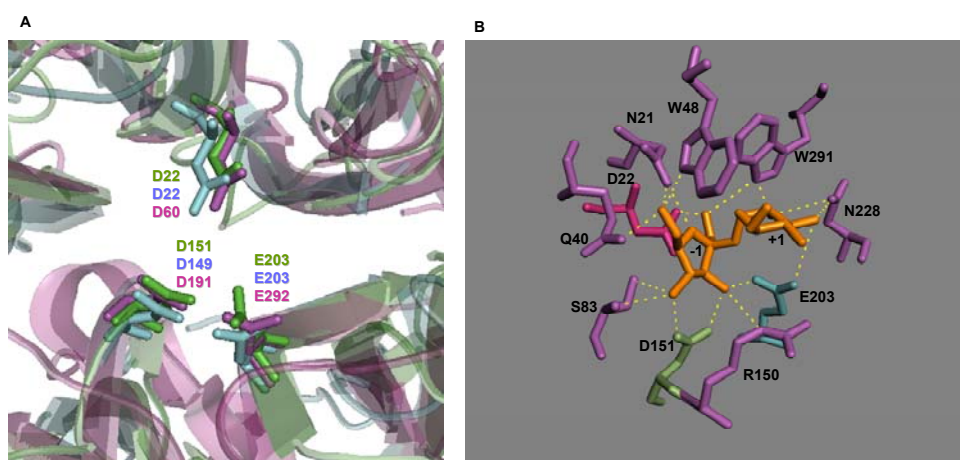


Figura 76. A: Superposición del modelo estructural de Suc2 (en verde), con las estructuras tridimensionales resueltas de la invertasa (2AC1) de *A. thaliana* (en azul) y la fructosiltransferasa (3LF7) de *A. japonicus* (en rosa). Se señalan en cada enzima los residuos que forman parte de la tríada catalítica. **B:** Residuos de la enzima Suc2 que establecen contactos polares (líneas amarillas discontinuas) con la sacarosa (en naranja). La orientación relativa del sustrato (sacarosa) en el centro activo de Suc2 se obtuvo mediante superposición del modelo de Suc2 con la invertasa de *A. thaliana* formando complejo con sacarosa (PDB 2QQW).

La mayoría de las estructuras resueltas de la familia GH32 corresponden a proteínas monoméricas. Sin embargo, en el caso de la

invertasa Suc2, en su forma nativa citoplasmática (no glicosilada), estudios previos han constatado que la enzima oligomeriza de forma dependiente del pH y de la concentración de iones cloruro. Según los datos de la bibliografía, en ausencia de cloruro, la enzima es un dímero que sólo se disrumpe a monómeros a un pH superior a 9.4 (Williams et al. 1985, Reddy et al. 1990). La adición de NaCl promueve la oligomerización de la enzima a pH 4.5 formando una mezcla de hexámeros y octámeros (Reddy et al. 1990). El análisis mediante cromatografía de exclusión molecular de la estructura cuaternaria de la invertasa Suc2 no glicosilada expresada en *E. coli* determinó que a pH 7 y una concentración de cloruro de 150 mM la proteína es un octámero.

Tabla 38. Residuos que forman puentes de H con el sustrato en el modelo estructural de Suc2 junto con sus homólogos en diferentes enzimas de la misma familia resueltas estructuralmente. *A. thaliana* Inv1 + sacarosa (PDB 2QQW), *T. maritima* Inv + rafinosa (PDB 1W2T) y *C. intybus* FEH IIa + sacarosa (PDB 2ADD). - determina que no existe residuo homólogo y * que el residuo homólogo no forma puente de hidrógeno con el sustrato en la estructura cristalográfica.

Suc2	<i>T. maritima</i> Inv	<i>A. thaliana</i> Inv1	<i>C. intybus</i> FEH IIa
Asn21	Asn16	Asn22	Asn20
Asp22	Asp17	Asp23	Asp22
Gln40	Gln33	Gln39	Gln38
Trp48	Trp41	Trp47	Phe46 *
Ser83	Ser75	Ser83	Ser83
Arg150	Arg137	Arg148	Arg146
Asp151	Asp138	Asp149	Asp147
Gln201	Glu188	Asp239	-
Glu203	Glu190	Glu203	Glu201
Asn228	Thr208	Lys242	-
Trp291	Trp260	-	-

La invertasa de *S. occidentalis* (que sirvió como molde en el modelado estructural de Suc2) presenta una estructura dimérica que no puede ser disociada sin perder la actividad enzimática (Alvaro-Benito et al. 2010a). Se identificaron en Suc2 los residuos homólogos a aquellos de la invertasa de *S. occidentalis* implicados en la formación de contactos polares entre monómeros (Tabla 39). Una parte importante (68%) de estos residuos son idénticos o se han sustituido por aminoácidos de similares propiedades químicas. Resulta interesante el caso del contacto entre los residuos Asn227 y Tyr462 de la invertasa de *S. occidentalis* cuyos homólogos en Suc2 son Tyr200 y Asn441 respectivamente. Es decir, en Suc2 se podría mantener el mismo tipo de interacción a pesar de que las sustituciones de cada residuo no hayan sido conservativas. En base a este análisis se puede interpretar que la mayor parte de las interacciones podrían estar conservadas en Suc2, y que por tanto, la orientación relativa de los monómeros para formar el dímero sería similar. En el caso de Suc2 el octámero podría estar constituido por un tetrámero de estos dímeros. En este contexto, el dominio C-terminal tendría un papel fundamental en la dimerización. En la invertasa de *S. occidentalis* se ha comprobado además que algunos de los residuos de este dominio podrían participar en la unión de sustratos de tamaño medio (nistosa) y largo (inulina) (Alvaro-Benito et al. 2010a, Reddy et al. 1990). Al deletar este dominio de Suc2, no se detectó acumulación de proteína soluble, confirmando como ya se había descrito anteriormente (Altenbach et al. 2004), que el dominio C-terminal es esencial en la estabilidad global de la enzima.

A pesar de numerosos intentos y de disponer de muestras de elevada pureza, no se habían conseguido obtener cristales de Suc2 de suficiente tamaño y calidad como para abordar la resolución cristalográfica de la estructura. La tendencia de la proteína a formar distintas formas oligoméricas podría haber sido la causa del problema. Recientemente, mediante la adición de cloruro de guanidinio, que según está descrito ayuda a desagregar proteínas, se consiguieron cristales de mayor tamaño que han dado un patrón de difracción de rayos X con una resolución considerablemente mejorada. En fechas próximas se espera optimizar las condiciones de cristalización y la resolución de la estructura obtenida por difracción de rayos X.

Tabla 39. Residuos que forman puentes de H en la superficie de contacto entre subunidades (moléculas A y B) que forman el dímero de la invertasa de *S. occidentalis* (Solnv) y sus homólogos en Suc2. Para los residuos de Solnv se indican entre paréntesis los átomos implicados en estos contactos y la distancia entre ellos se muestra en la columna central. C-D: dominio catalítico; β -D: dominio β -sándwich.

Molécula A		Distancia (Å)	Molécula B	
Suc2 C-D	Solnv C-D		Solnv C-D	Suc2 C-D
Gln171	Gln199 (NE2)	3.20	Asn343 (OD1)	Asn321
Gln171	Gln199 (O)	2.99	Asn343 (ND2)	Asn321
Gln171	Gln199 (O)	2.51	Thr346 (OG1)	Thr324
Asn194	Ser221 (O)	3.25	Ser281 (OG)	Asn255
Glu195	Ser222 (OG)	3.11	Ser281 (O)	Asn255
Glu195	Ser222 (OG)	2.50	Ser281 (OG)	Asn255
Gly196	Gly223 (N)	3.22	Ser281 (O)	Asn255
Tyr200	Asn227 (O)	3.29	Asn343 (ND2)	Asn321
Ser257	Thr283 (N)	3.11	Gly223 (O)	Gly196
Ser257	Thr283 (OG1)	2.36	Thr283 (OG1)	Ser257
Suc2 C-D	Solnv C-D		Solnv β -D	Suc2 β -D
Tyr200	Asn227 (OD1)		Tyr462 (OH)	Asn441
Trp291	Trp314 (O)	3.82	Gln435 (NE2)	Ala413
Suc2 β -D	Solnv β -D		Solnv β -D	Suc2 β -D
Lys429	Arg451 (NE)		Ser434 (OG)	Ser412
Glu430	Lys452 (O)	3.45	Lys458 (NZ)	Arg437
Asn431	Gln453 (NE2)	3.30	Tyr439 (OH)	Phe417
Asn431	Gln453 (NE2)	2.37	Thr409 (OG1)	Ser386
Phe434	Phe455 (O)	3.86	Lys458 (NZ)	Arg437
Thr435	Thr456 (OG1)	3.63	Lys458 (O)	Arg437

2.2 Estudio comparativo de la actividad transfructosilante de Suc2 frente a otras enzimas de la familia GH32

Bajo las condiciones ensayadas todas las enzimas mostraron un patrón de producción de FOS muy similar, incluso la exo-inulinasa de *A. niger* que presenta un 100% de homología de secuencia polipeptídica con una enzima de *A. foetidus* clasificada como transferasa. Dicha enzima según la bibliografía sintetiza principalmente 1-kestosa siendo productos minoritarios de la reacción 6-kestosa y neokestosa (Rehm et al. 1998). Las diferencias entre los resultados obtenidos en el presente trabajo respecto a lo descrito en la bibliografía se podrían deber al método de análisis utilizado (cromatografía en capa fina vs HPLC Dionex).

2.3 Determinantes para la mejora de la capacidad transfructosilante de Suc2: discriminación del aceptor del grupo fructosilo

Tal como se ha comentado, la relación de actividades transfructosilante/hidrolasa de las enzimas de la familia GH32 depende en gran medida de las características estructurales del centro activo para discriminar entre sacarosa o H₂O como aceptor del grupo fructosilo. La mayor parte de estudios de mutagénesis dirigida encaminados a dilucidar los determinantes estructurales que definen este ratio se han llevado a cabo con enzimas de plantas.

El intento de aumentar la hidrofobicidad en el entorno del centro activo (mutaciones GVW y VVV) no tuvo resultados satisfactorios con respecto a la mejora de la capacidad transfructosilante de Suc2. Sólo la mutación VVV es capaz de aumentar la síntesis de FOS respecto a la hidrólisis pero también repercute en la actividad enzimática de forma importante, por lo que dicha mutación no resulta interesante a nivel industrial.

Además de las fuerzas polares involucradas en el reconocimiento de carbohidratos, otras interacciones también juegan un papel importante en la estabilización del complejo azúcar-enzima. Los residuos que forman el bolsillo hidrofóbico (Tabla 40) están implicados en la unión óptima y estable de la sacarosa en enzimas del clan GH-J, probablemente mediante interacciones entre anillos aromáticos y anillos del azúcar a través de fuerzas

de Van der Waals y de interacciones π -CH (Le Roy et al. 2007). La sustitución de estos residuos por otros no aromáticos provoca una pérdida importante de la afinidad por el sustrato (Homann et al. 2007, Le Roy et al. 2007, Ozimek et al. 2006). Sin embargo, las mutaciones que implican una sustitución por otro residuo también aromático han mostrado un efecto positivo sobre la capacidad transfructosilante de la enzima en algunos casos. Al sustituir el residuo equivalente al Trp19 de Suc2 por Tyr en la invertasa de *Allium cepa* se mejora su capacidad transfructosilante, lo que no ocurre con Suc2, ni tampoco con las invertasas de *Triticum aestivum* (Ritsema et al. 2006, Schroeven et al. 2008), y de *S. occidentalis* (Alvaro-Benito et al. 2010b). Las diferencias en el entorno o la orientación de estos residuos en las distintas enzimas podrían explicar estas divergencias de comportamiento.

En otro estudio, un alineamiento de diferentes enzimas GH32 de plantas mostró que el motivo "W(G/S)W" de invertasas se ha reemplazado por el motivo "W(G/A)Y" en transferasas (Altenbach et al. 2009). La mutagénesis del segundo Trp de este motivo en la invertasa de *Allium cepa* por Tyr dio lugar a un aumento de la eficiencia transfructosilante de la enzima. El homólogo estructural de este residuo en Suc2 es el Trp287, aunque se localiza en un motivo de secuencia (WASNW) distinto del de enzimas de plantas, pero relativamente conservado en enzimas fúngicas. El primer Trp de este motivo es el Trp287 mientras que el segundo (Trp291) se sitúa en la zona de entrada al centro activo. El residuo Trp287 parece tener un papel determinante en el mantenimiento de la estabilidad estructural de Suc2 ya que tanto la mutación W287Y como la sustitución completa del motivo WASNW por la secuencia WGY disminuyeron notablemente los niveles de proteína soluble en *E. coli*. La mutación W291Y mantuvo la estabilidad global de la enzima pero disminuyó considerablemente su eficiencia catalítica y no mejoró su capacidad transfructosilante. Por tanto, los residuos de triptófano del motivo WASNW de invertasas de levaduras parecen cumplir un papel distinto a los del motivo W(G/S)W de enzimas de plantas.

Por otro lado es interesante el hecho de que en enzimas de plantas la posición equivalente a la Phe82 de Suc2 suele ser un Trp en aquellas invertasas que hidrolizan exclusivamente sacarosa mientras que las fructan exohidrolasas (FEH) suelen presentar una Phe (Lammens et al. 2009), sugiriendo que la presencia de un residuo de carácter menos hidrofóbico en esta posición favorece la unión de FOS respecto a sacarosa. En la estructura

de la fructan 1-exohidrolasa de *C. intybus* se determinó que, a pesar de presentar un triptófano en esta posición, la orientación del mismo difería completamente de la del homólogo en la invertasa de *A. thaliana* (Lammens et al. 2009). En el caso de secuencias de invertasa de levaduras, en esta posición se encuentra fenilalanina o, en menor proporción tirosina, lo que podría indicar también una preferencia por la unión de FOS en estas enzimas. De hecho, se ha determinado que la β -fructofuranosidasa de la levadura *Schwanniomyces occidentalis* presenta una afinidad mayor (menor constante de Michaelis) por FOS como la 1-kestosa y nistosa que por la sacarosa, aunque la constante catalítica para la reacción de hidrólisis sea mayor para la sacarosa que para los otros dos sustratos (Alvaro-Benito et al. 2007). La mutación F82W no estudiada hasta ahora no consiguió mejorar la síntesis de FOS respecto a la enzima Suc2 nativa. Sin embargo, esta mutación podría tener interés si la presencia de un triptófano en esta posición incrementa la preferencia de la enzima por sacarosa vs FOS como sustrato donador. En este caso, la combinación de la mutación F82W con otras mutaciones que incrementen la capacidad transfructosilante de la enzima podría aumentar la estabilidad cinética de los FOS sintetizados, es decir, ralentizar su hidrólisis.

Por tanto, tres de los cuatro residuos que forman el bolsillo hidrofóbico no parecen estar implicados directamente en la capacidad transfructosilante de la invertasa Suc2. Sería interesante analizar qué efectos provocaría la mutación del Trp48 ya que en esta posición el requerimiento de un residuo hidrófobo parece más laxo, sustituyéndose de hecho por residuos polares en enzimas del mismo clan que sintetizan enlaces glicosídicos $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$ como las levansucrasas e inulosucrasas (Tabla 40).

Los mejores resultados en cuanto al incremento de la capacidad transfructosilante de Suc2 se han conseguido mediante mutagénesis en el entorno del residuo nucleófilo (motivo NDPNG) y del residuo ácido/base (motivo ECP).

Respecto al motivo NDPNG, el modelo estructural de Suc2 indica que las Asn21 y 24 están implicadas en una red de puentes de hidrógeno conservada en invertasas de plantas resueltas estructuralmente (Figura 77A). La Asn21 de Suc2 interaccionaría tanto con el grupo fructosilo de la sacarosa como con el nucleófilo Asp22 y el Trp19, mientras que la Asn24 podría establecer un velcro molecular entre dos hojas beta mediante puentes de

hidrógeno con los residuos Gln40 y Ser83, que a su vez interaccionarían con el Asp22 nucleófilo.

Tabla 40. Residuos homólogos de Suc2 y otras enzimas de la familia GH32 y GH68 que forman parte del bolsillo hidrofóbico que rodea al sustrato. Se han marcado con un * aquéllas que están resueltas estructuralmente. Invertasa *T. aestivum* (Q575T1-1), invertasa *A. cepa* (O81083), levansucrasa de *B. megaterium* (ADF38426.1) e inulosucrasa de *L. reuteri* (Q8GP32-1).

Invertasa Suc2	<i>S. cerevisiae</i>	Trp19	Trp48	Phe82	Trp287
Invertasa (PDB:1UYP) *	<i>T. maritima</i>	Trp14	Trp41	Phe74	Trp260
Exo-inulinasa (PDB:1Y4W) *	<i>A. awamori</i>	Trp38	Trp65	Phe102	Trp335
Invertase (PDB:3KF5) *	<i>S. occidentalis</i>	Trp24	Trp53	Phe87	Trp287
Fructan 1-exohidrolasa IIa (PDB:1ST8) *	<i>C. intybus</i>	Trp19	Phe46	Trp82	Trp292
Invertasa (PDB:2AC1) *	<i>A. thaliana</i>	Trp20	Trp47	Trp82	Trp297
Fructosiltransferasa (PDB:3LF7) *	<i>A. japonicus</i>	Gln57	-	Phe118	Trp398
Invertasa	<i>T. aestivum</i>	Trp141	Trp168	Trp204	Trp422
Invertasa	<i>A. cepa</i>	Trp161	Trp188	Trp223	Trp440
Levansucrasa	<i>B. megaterium</i>	Trp131	Asp163	Trp209	Tyr458
Inulosucrasa	<i>L. reuteri</i>	Trp271	Asn303	Trp340	Tyr599

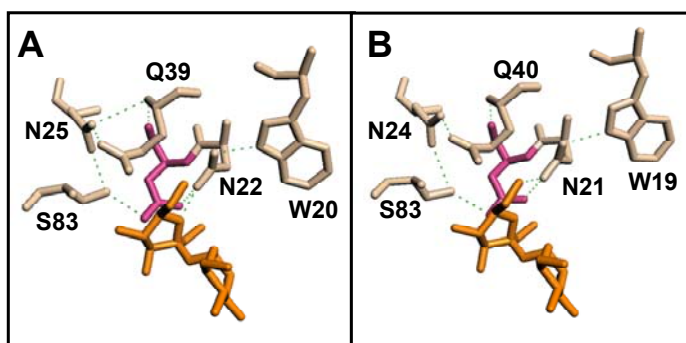


Figura 77. Red de puentes de hidrógeno posiblemente involucrados en la capacidad hidrolítica/transfructosilante en el entorno del residuo nucleófilo. Están marcados el aspártico nucleófilo (violeta), y el sustrato (sacarosa) en naranja. **A)** Invertasa de *A. thaliana* y **B)** Suc2.

Las mutaciones N21S y N24S, incrementaron la síntesis de 6-kestosa en 6 y 5.4 veces respectivamente en relación a la enzima nativa, resultados que están en sintonía con estudios previos con invertasas de plantas, en las que se mutagenizaron posiciones equivalentes (Ritsema et al. 2006, Schroeven et al. 2008). La combinación de estas mutaciones con la W19Y, que no tiene ningún efecto por sí sola en la mejora de la capacidad transfructosilante, produjo un incremento en la síntesis de 6-kestosa de casi el doble respecto a la mutación simple N21S mientras que no tuvo un efecto significativo en comparación con la mutación simple N24S. Este efecto sinérgico entre las mutaciones W19Y/N21S es semejante a lo descrito mediante mutaciones equivalentes en la invertasa de *T. aestivum* (Schroeven et al. 2008) y se puede explicar en base a la posible interacción estructural entre estos dos residuos (Figura 77B).

La mutación P205V del motivo ECP en la enzima Suc2 incrementó la transfructosilación 5 veces respecto a la proteína nativa. La mutación equivalente en la invertasa de *S. occidentalis* provocó también un efecto positivo sobre la transfructosilación (Alvaro-Benito et al. 2010b). La base estructural de este efecto podría encontrarse en la rigidez estructural que confiere el residuo de prolina. La prolina presenta un anillo de pirrolidina que debido a su especial conformación aumenta la rigidez del enlace peptídico, dificultando que este residuo se encuentre normalmente en el centro de estructuras secundarias como hélices- α u hojas- β (Li et al. 1996, Shamsir y Dalby 2007). En el caso de Suc2, la Pro205 se encontraría en medio de una hoja beta y podría ocasionar cambios significativos en la conformación local de residuos próximos. En concreto la Cys204 contigua podría jugar un papel crucial en este contexto. En la invertasa Suc2 nativa esta Cys formaría un puente de hidrógeno con el Asp151 (estabilizador del estado de transición) (Figura 78). Un cambio de orientación podría romper esta interacción o permitir la formación de un puente de hidrógeno entre esta misma Cys y el Glu203 ácido/base afectando a su pK_a , y por consiguiente a las propiedades catalíticas de la enzima. La modificación del pK_a de residuos críticos en el centro activo repercutiría en el pH óptimo de la enzima como de hecho ocurre. La mutación P205V incrementa el pH óptimo de Suc2 análogamente a lo que ocurre en mutaciones equivalentes en enzimas de plantas (Goetz y Roitsch 1999).

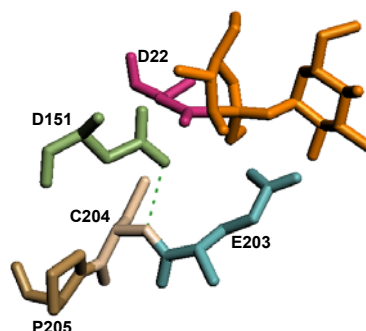


Figura 78. Puente de hidrógeno entre el Asp151 (estabilizador del estado de transición) y la Cys204 en el modelo estructural de Suc2. Se representa en naranja una molécula de sacarosa.

2.4 Determinantes de la especificidad del producto de transfructosilación: orientación de la molécula aceptora

Además de elucidar los requerimientos estructurales que implican un aumento de la capacidad transfructosilante, otro aspecto interesante en el estudio de invertasas/transferasas es el patrón de FOS sintetizado. La especificidad del producto de transfructosilación de cada enzima dependerá de la orientación relativa entre la molécula aceptora (sacarosa en el presente estudio) y el fructosilo unido covalentemente a la enzima en el estado de transición. En invertasas de plantas estudiadas hasta ahora el producto de transfructosilación mayoritario es la 1-kestosa (enlace $\beta(2-1)$) mientras que en Suc2 y en la invertasa de *S. occidentalis* se sintetiza principalmente 6-kestosa (enlace $\beta(2-6)$).

Las mutaciones que hemos realizado en los motivos MNDPNG y ECP aumentaron específicamente la capacidad de síntesis de 6-kestosa sin afectar a la producción de 1-kestosa. Las mutaciones equivalentes a N21S, N24S y P205V en invertasas de plantas y en la de *S. occidentalis* no provocaron un cambio significativo en el patrón de FOS sintetizado (Alvaro-Benito et al. 2010). Sin embargo, en la transferasa 6G-FFT de *A. cepa* la doble mutación N84A/S87N (posiciones equivalentes a Asn21 y Asn24 de Suc2 respectivamente), causó un cambio en la especificidad del producto sintetizado. La 6G-FFT nativa sintetiza tanto fructanos tipo neokestosa vía enlace $\beta(2-6)$ entre la fructosa y la glucosa como tipo inulina vía enlace $\beta(2-1)$

entre fructosas mientras que la 6G-FFT N84A/S87N sintetiza principalmente fructanos tipo 1-kestosa (Ritsema et al. 2004). Por tanto, no podemos descartar que sustituciones diferentes en estos mismos residuos (como, por ejemplo, N21A) no provoquen efectos distintos en la especificidad del producto de reacción.

Los resultados más concluyentes en este trabajo en cuanto al estudio de la especificidad del producto de transfructosilación sintetizado son los que provienen de la mutagénesis de la Asn228. La alta especificidad para la síntesis de 6-kestosa del mutante N21S desapareció completamente al introducir la mutación N228A, mientras que los mutantes N228R no mostraron ninguna actividad transfructosilante. Estos resultados, combinados con los estudios de docking de 6-kestosa con el modelo de Suc2 (Figura 79), apoyan la hipótesis de que la Asn21 constituya un elemento de anclaje de la sacarosa en el sitio de unión del sustrato aceptor, fijándolo en una orientación determinada. Según este modelo estructural, el anillo del grupo glucosilo se situaría en un plano paralelo al Trp291, que podría servir por tanto como plataforma de unión hidrofóbica del azúcar aceptor. La sustitución de la Asn228 por otro residuo más voluminoso como la arginina podría interferir seriamente con la unión de la sacarosa en este sitio, destruyendo la actividad transferasa. El reemplazamiento por otro residuo menos voluminoso y sin capacidad para formar puentes de hidrógeno, como la alanina, dejaría espacio para la unión de la sacarosa en el sitio aceptor por medio del Trp291 con cierto margen de orientaciones relativas. Esta unión más laxa permitiría la formación de enlaces $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$ con eficiencias similares. Aunque, trabajos previos han resaltado la importancia de residuos homólogos de proteínas del mismo clan en la especificidad del producto de transfructosilación, hasta ahora no se habían encontrado determinantes estructurales involucrados en la especificidad de síntesis de enlaces $\beta(2-1)$ vs $\beta(2-6)$ (Van den Ende et al. 2009). Así, el equivalente estructural a la Asn228 de Suc2 de la levansucrasa SacB de *B. subtilis* (P05655-1, PDB: 1OYG), la Arg360 (Figura 80), juega un papel determinante en la polimerización ya que si se sustituye este residuo por lisina, leucina o serina, las enzimas mutantes solo son capaces de sintetizar el trisacárido kestosa, pero no de formar levano (Chambert y Petit-Glatron 1991). Por otro lado, si se muta la Arg370 de la levansucrasa SacB de *B. megaterium* (homólogo estructural de la Asn228 de Suc2) a alanina, se produce un cambio en el patrón de oligosacáridos obtenidos, incrementando el porcentaje de enlaces

tipo neokestosa respecto al tipo 1- ó 6-kestosa (Homann et al. 2007, Kralj et al. 2008). Finalmente, la mutación W343R en la enzima 6G-FFT de *L. perenne*, en posición equivalente a las anteriores, hace que esta transferasa pase de generar neokestosa y nistosa a sintetizar sólo nistosa (Lasseur et al. 2009). Por tanto, parece claro que el locus estructural ocupado por la Asn228 está involucrado en la orientación del sustrato aceptor pero ésta será diferente dependiendo del entorno particular dentro del centro activo de cada enzima, promoviéndose un tipo de enlace u otro.

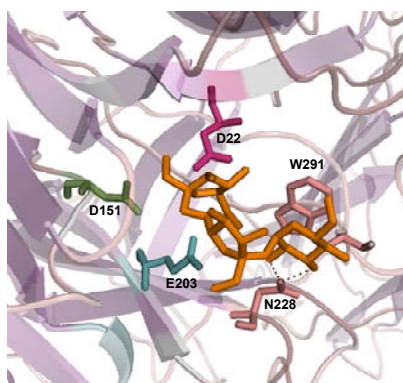


Figura 79. Acoplamiento “docking” del modelo estructural de la invertasa Suc2 de *S. cerevisiae* con el trisacárido 6-kestosa (coloreada en naranja). Están señalados los residuos catalíticos (D22, D151 y E203), el Trp291, así como la Asn228, el único residuo que establecería contactos polares (líneas negras discontinuas) con el grupo glucosilo de la 6-kestosa.

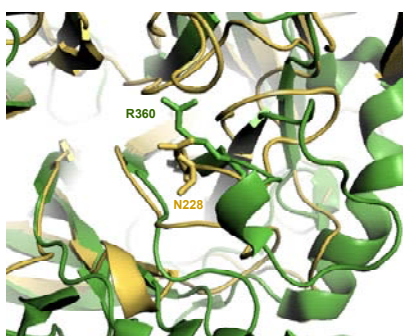


Figura 80. Superposición del modelo de la invertasa Suc2 en amarillo, con la estructura resuelta de la levansucrasa SacB de *B. subtilis* (1OYG) en verde mediante el software online DaliLite. Se señalan el residuo Asn228 de Suc2 y su homólogo en SacB.

2.5 Características cinéticas de los mutantes con mejor actividad transfructosilante

Diversas mutaciones en el motivo WMNDPNG tuvieron efectos beneficiosos en la capacidad transfructosilante de Suc2. Con el propósito de definir más en profundidad los efectos que ocasionan estas mutaciones respecto a la enzima nativa Suc2, se analizaron las propiedades catalíticas de los mutantes.

Según la bibliografía, la invertasa de *S. cerevisiae* sigue básicamente un comportamiento de Michaelis-Menten pero sufre inhibición por sustrato (sacarosa) e inhibición por producto (la fructosa actúa como inhibidor competitivo y la glucosa como inhibidor no competitivo parcial) (Combes y Monsan 1983). En cuanto a la inhibición por sustrato, en estudios previos se observó una disminución brusca de la actividad a 25°C a concentraciones de sacarosa superiores a 200 mM (Combes y Monsan 1983). Sin embargo, en las condiciones de nuestro ensayo (50°C) sólo se detectó una ligera disminución de actividad cuando la concentración de sustrato llegó a 1 M, lo que sugiere que a temperaturas altas se alivia el efecto inhibitorio de la sacarosa. Los mutantes N21S, N24S y W19Y/N21S también siguieron una cinética tipo Michaelis-Menten mostrando cierta inhibición por sustrato que se manifestó sólo a concentraciones altas de sacarosa (1 M en el caso de N24S y a 1.5 M en los mutantes N21S y W19Y/N21S).

Comparando las características cinéticas de los mutantes N21S y N24S se pueden apreciar claras diferencias. La mutación N21S disminuye la afinidad de la enzima por la sacarosa respecto a Suc2 (aumenta su K_m) mientras que la k_{cat} es similar. En el caso del mutante N24S, la K_m no varía demasiado pero la k_{cat} disminuye considerablemente. El diferente impacto de estas mutaciones sobre el valor de K_m se puede deber a que la mutación N21S rompería un contacto directo entre la enzima y el sustrato (Figura 77), mientras que la mutación N24S a pesar de que pudiera dejar más libertad de rotación a los residuos Gln40 y Ser83, no impediría que puedan seguir interaccionando con el sustrato. Estudios previos con mutantes en el motivo WMNDPNG de invertasas de plantas mostraron también un incremento en su K_m respecto a la enzima nativa de forma concomitante al aumento de la capacidad transfructosilante (aunque en menor medida que lo que ocurre en Suc2) (Tabla 41) (Ritsema et al. 2006, Schroeve et al. 2008). De hecho, las invertasas suelen tener valores de K_m para sacarosa del orden de milimolar

mientras que las transferasas se saturan difícilmente con el sustrato, estimándose valores de K_m en el rango 0,1-1 M (Altenbach et al. 2009, Ritsema et al. 2006).

Cabe destacar que estos cambios en los valores de K_m pueden tener efectos importantes sobre la actividad de la enzima a tiempos largos de reacción. Así, el mutante N24S, para una velocidad inicial similar a la del resto, mantiene una tasa de liberación de glucosa mayor a tiempos de incubación más largos. Esto puede explicarse porque el N24S presenta una mayor afinidad por la sacarosa (menor K_m) de modo que conforme avanza la reacción y disminuye la cantidad de sustrato disponible, este mutante es capaz de mantener su actividad mientras que en el resto de enzimas la cinética se frena considerablemente. Este comportamiento parece estar relacionado con la particular cinética de la 6-kestosa que tiene una vida media más corta con N24S que con el resto de mutantes. Esto podría deberse también a una mayor afinidad de N24S por la 6-kestosa como sustrato donador, que ocasionaría una hidrólisis más rápida de la misma antes de alcanzar concentraciones elevadas en el medio de reacción.

Tabla 41. Valores de k_{cat} y K_m para la sacarosa de diferentes invertasas y de sus mutantes.

	$k_{cat} (s^{-1})$	$K_m (mM)$
Suc2	3430 ± 170	38 ± 7
Invertasa <i>S. occidentalis</i>	106 ± 7	6.4 ± 0.4
Invertasa <i>A. thaliana</i>	59 ± 4	0.35 ± 0.05
Invertasa <i>A. cepa</i>	-	5.8 ± 1.9
Invertas <i>A. cepa</i> W161Y	-	29 ± 7
Invertasa <i>A. cepa</i> N166S	-	13 ± 2
Invertasa <i>A. cepa</i> W161Y/N166S	-	19 ± 6
Invertasa <i>T. aestivum</i>	-	15 ± 6
Invertasa <i>T. aestivum</i> W23Y	-	152 ± 6
Invertasa <i>T. aestivum</i> N25S	-	215 ± 11
Invertasa <i>T. aestivum</i> W23Y/N25S	-	43 ± 11

La producción máxima de FOS de una enzima en particular depende del ratio de transfructosilación e hidrólisis de los compuestos sintetizados (Nguyen et al. 2005). La cinética de síntesis-degradación de FOS muestra que la producción máxima de 6-kestosa de los mejores mutantes en este trabajo es de 370 mM (186 g/l), lo que equivale a un 32% del total de azúcares de la mezcla. Según lo descrito en la bibliografía, la enzima con mayor producción de 6-kestosa es la invertasa de *S. occidentalis* que en su versión wt produce 76 g/l en su máximo cinético (Alvaro-Benito et al. 2007). Recientemente se ha conseguido aumentar la capacidad transfructosilante de esta enzima llegando a sintetizar 6-kestosa hasta el 20% del total de azúcares de la mezcla (Alvaro-Benito et al. 2010). Por tanto, el rendimiento de síntesis de 6-kestosa obtenido con los mutantes de la invertasa Suc2 es el mayor conseguido hasta la fecha.

A la vista de los resultados obtenidos, uno de los factores clave para aumentar la capacidad transfructosilante parece ser la disminución de la rigidez estructural del centro activo. En algunos casos (mutación N21S) esto se ha conseguido disminuyendo directamente el número de interacciones con el sustrato donador, lo cual tiene como consecuencia la pérdida de afinidad por el mismo. En otros, las mutaciones introducidas (N24S y P205V), podrían provocar un aumento de la flexibilidad de residuos que interaccionan con el sustrato o de residuos catalíticos. Esta pérdida de rigidez podría facilitar el posicionamiento del sustrato aceptor en una orientación adecuada para que se produzca la reacción de transfructosilación. La fuerte dependencia de la actividad transfructosilante de W19Y/N21S y P205V con el pH sugiere también que otro factor importante puede ser el pK_a del residuo ácido-base, y que la desprotonación del sustrato aceptor esté favorecida sobre la de las moléculas de agua.

La resolución estructural de la enzima wt y de los mutantes en complejo con el sustrato aportará información esencial para comprender mejor los cambios estructurales originados por las mutaciones introducidas.

2.6 Aplicaciones biotecnológicas y perspectivas futuras

Analizando distintos aspectos (actividad, capacidad de transfructosilación y especificidad en el producto sintetizado) el mutante con las propiedades más adecuadas para ser utilizado en la industria biotecnológica en la producción de 6-kestosa sería el mutante W19Y/N21S.

Si la industria requiriera la producción conjunta de 1-kestosa y 6-kestosa, el mutante N228A/N21S reuniría las características adecuadas para tal fin.

Una vez seleccionadas las mejores enzimas mutantes, el siguiente paso será sintetizarlas en *S. cerevisiae*, como organismo GRAS, aceptado para la producción de aditivos alimentarios. Para tal fin, convendría utilizar un vector de expresión con un promotor eficiente en *S. cerevisiae* (como el promotor Suc1) (Gozalbo y del Castillo Agudo 1994) y fusionar la secuencia codificante con un péptido señal que promueva la secreción de la enzima (como la secuencia señal del gen *STA1* o la propia de Suc2) (Marín-Navarro et al. 2011). No se prevé que las variantes enzimáticas seleccionadas tengan ningún problema para plegarse correctamente y mantener sus propiedades enzimáticas en este sistema de expresión, al tratarse del organismo de donde se extrajo el gen *SUC2* nativo. Otra línea de investigación futura sería intentar conseguir que esta enzima utilizara preferentemente la sacarosa respecto a los FOS como sustrato donador del grupo fructosilo. De esta forma disminuiría la hidrólisis de los FOS sintetizados, aumentando su tiempo de vida medio e incrementando el rendimiento de producción. En el presente trabajo no hemos profundizado en aspectos tales como la especificidad de sustrato de los mutantes respecto a la enzima nativa. Sin duda sería interesante analizarlo para conocer más detalles acerca de la implicación de estos residuos en la afinidad de la enzima por un sustrato u otro. Con la aparición de la estructura tridimensional de la fructosiltransferasa de *A. japonicus* (Chuankhayan et al. 2010), se abren además, nuevas dianas de mutagénesis ya que esta enzima a pesar de pertenecer a la misma familia GH32, presenta grandes diferencias respecto a otras invertasas y transferasas en motivos de secuencia que parecen claves para determinar la capacidad transfructosilante de estas enzimas.

Hoy en día también se optimiza la producción de FOS incorporando otro tipo de enzimas, como por ejemplo la glucosa-oxidasa o glucosa-isomerasa, para degradar o transformar los productos que actúan como inhibidores de la reacción. Una alternativa quizás más provechosa sería incorporar enzimas que fueran capaces de utilizar la glucosa y la fructosa libre para sintetizar de nuevo sacarosa, como sería el caso de la sacarosa-sintasa, reciclando de nuevo el sustrato para la reacción de transfructosilación.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral se resumen en las siguientes conclusiones:

1. La levadura D aislada a partir de tierra asociada a raíces de *Allium sativum*, a la vista de los resultados obtenidos, representa una nueva especie de levadura, filogenéticamente próxima a *Wickerhamomyces onychis*, que hemos denominado *Wickerhamomyces navarrensis*.
2. *W. navarrensis* está dotada de una invertasa de la familia GH32 con capacidad transfructosilante, que sintetiza tanto 1-kestosa como 6-kestosa.
3. La invertasa Suc2 de *S. cerevisiae*, al igual que la inulinasa de *K. marxianus* y la exo-inulinasa de *A. niger*, presenta también cierta capacidad transfructosilante de forma basal, y muestra un patrón de producción de FOS muy semejante, sintetizando 6-kestosa y 1-kestosa a concentraciones inferiores a 20 g/l.
4. Las mutaciones simples realizadas en el bolsillo hidrofóbico de Suc2 no tienen efecto *per se* sobre su capacidad transfructosilante.
5. Las mutaciones N21S y N24S del motivo β -fructosidasa aumentan en 6 veces la producción de 6-kestosa, sin afectar a la síntesis de 1-kestosa. La incorporación de la mutación W19Y tiene un efecto sinérgico con la mutación N21S, pero no con N24S, incrementando la síntesis de 6-kestosa hasta 12 veces, lo que puede deberse a la proximidad estructural entre la Asn21 y el Trp19.
6. Las sustituciones N21S y N24S tienen un impacto muy distinto sobre las constantes cinéticas, ocasionando un aumento de la K_m en el primer caso y una disminución de la k_{cat} en el segundo. Probablemente como consecuencia de estas diferencias la vida media de los FOS producidos utilizando el mutante N24S es considerablemente menor que con el resto de mutantes en el motivo β -fructosidasa.

7. La mutación P205V del motivo ECP incrementa la síntesis de 6-kestosa 5 veces respecto a la proteína nativa, sin alterar la producción de 1-kestosa. Sin embargo, la incorporación de la sustitución P205V (en el entorno del residuo ácido-base) sobre la doble mutación W19Y/N21S (en el entorno del residuo nucleófilo) no consigue incrementar la capacidad transfructosilante por encima de la obtenida con esta última.
8. La sustitución N228A no afecta a la capacidad transfructosilante por sí sola pero la doble mutación N21S/N228A incrementa la síntesis de FOS totales respecto a las mutaciones simples y además, modifica la especificidad de producto sintetizándose cantidades equimolares de 1-kestosa y 6-kestosa. Esto sugiere que el locus estructural ocupado por la Asn228 está involucrado en la orientación del sustrato aceptor y determina la especificidad de síntesis de enlaces $\beta(2-1)$ vs $\beta(2-6)$.
9. En el rango de pH entre 3.8-5.7 la actividad hidrolítica de Suc2 es óptima en torno a pHs 3.8-4.8 mientras que la producción de FOS no muestra variaciones significativas. Los mutantes P205V y W19Y/N21S muestran un desplazamiento del pH óptimo de la actividad global hacia valores entre 4.8-5.7. Esto se debe principalmente a que la actividad transfructosilante es especialmente sensible a valores de pH inferiores a 4.8, mientras que la actividad hidrolítica no muestra una dependencia tan fuerte con el pH. Como consecuencia, el ratio de transfructosilación vs hidrólisis aumenta significativamente a pHs menos ácidos.
10. Las propiedades del mutante W19Y/N21S en cuanto a actividad global, máximo rendimiento de FOS y vida media de los mismos, lo convierten en el mejor candidato para la síntesis selectiva de 6-kestosa, mientras que el mutante N21S/N228A sería la mejor elección para la producción conjunta de 1-kestosa y 6-kestosa.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberto F, Bignon C, Sulzenbacher G, Henrissat B, Czjzek M** (2004) The Three-dimensional Structure of Invertase (beta-Fructosidase) from *Thermotoga maritima* Reveals a Bimodular Arrangement and an Evolutionary Relationship between Retaining and Inverting Glycosidases. *J.Biol.Chem.* **279**:18903-18910.
- Altenbach D, Nüesch E, Meyer AD, Boller T, Wiemken A** (2004) The large subunit determines catalytic specificity of barley sucrose:fructan 6-fructosyltransferase and fescue sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase. *FEBS Letters* **567**:214-218.
- Altenbach D, Rudino-Pinera E, Olvera C, Boller T, Wiemken A, Ritsema T** (2009) An acceptor-substrate binding site determining glycosyl transfer emerges from mutant analysis of a plant vacuolar invertase and a fructosyltransferase. *Plant Mol.Biol.* **69**:47-56.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol.Biol.* **215**:403-410.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Alvaro-Benito M, de AM, Fernandez-Arrojo L, Plou FJ, Jimenez-Barbero J, Ballesteros A, Polaina J, Fernandez-Lobato M** (2007) Characterization of a beta-fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. *J.Biotechnol.* **132**:75-81.
- Alvaro-Benito M, Polo A, Gonzalez B, Fernandez-Lobato M, Sanz-Aparicio J** (2010a) Structural and kinetic analysis of *Schwanniomyces occidentalis* invertase reveals a new oligomerization pattern and the role of its supplementary domain in substrate binding. *J Biol Chem.* **285**:13930-13941.
- Alvaro-Benito M, De Abreu M, Portillo F, Sanz-Aparicio J, Fernandez-Lobato M** (2010b) New insights into the fructosyltransferase activity of *Schwanniomyces occidentalis* beta-fructofuranosidase emerging from a non-conventional codon usage and directed mutation. *Appl.Environ.Microbiol.* **76**:7491-7499.

- Anglani C** (1998) Sorghum carbohydrates - A review. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)* **52**:77-83.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Shwede T** (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**:195-201.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Dore J, Consortium M, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P** (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* advance online publication.
- Ballantyne CM, Olsson AG, Cook TJ, Mercuri MF, Pedersen TR, Kjeldshus J** (2001) Influence of Low High-Density Lipoprotein Cholesterol and Elevated Triglyceride on Coronary Heart Disease Events and Response to Simvastatin Therapy in 4S. *Circulation* **104**:3046-3051.
- Belloch C, Fernandez-Espinar T, Querol A, Dolores GM, Barrio E** (2002) An analysis of inter- and intraspecific genetic variabilities in the *Kluyveromyces marxianus* group of yeast species for the reconsideration of the *K. lactis* taxon. *Yeast*. **19**:257-268.
- Berg RD** (1996) The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* **4**:430-435.
- Beylot M** (2005) Effects of inulin-type fructans on lipid metabolism in man and in animal models. *Br.J.Nutr.* **93**:S163-S168.
- Bhadra B, Begum Z, Shivaji S** (2008) *Pichia garciniae* sp. nov., isolated from a rotten mangosteen fruit (*Garcinia mangostana* L., *Clusiaceae*). *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:2665-2669.
- Blaut M** (2002) Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur.J.Nutr.* **41**:111-116.

- Boehm G, Stahl B, Jelinek J, Knol J, Miniello V, Moro GE** (2005) Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas. *Acta Paediatr. Suppl.* **94**:18-21.
- Boekhout T** (2005) Biodiversity: Gut feeling for yeasts. *Nature* **434**:449-451.
- Bornet FR** (1994) Undigestible sugars in food products. *Am J Clin Nutr* **59**:763S-769S.
- Bornet FR, Brouns F, Tashiro Y, Duvillier V** (2002) Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Dig. Liver Dis.* **34**:S111-S120.
- Brighenti F** (2007) Dietary fructans and serum triacylglycerols: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Nutr.* **137**:2552S-2556S.
- Burcelin R** (2005) The incretins: a link between nutrients and well-being. *Br. J. Nutr.* **93**:S147-S156.
- Calame W, Weseler AR, Viebke C, Flynn C, Siemensma AD** (2008) Gum arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose-dependent manner. *Br. J. Nutr.* **100**:1269-1275.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B** (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucl. Acids Res.* **37**:D233-D238.
- Carlson M, Botstein D** (1983) Organization of the SUC gene family in *Saccharomyces*. *Mol. Cell Biol.* **3**:351-359.
- Carlson M, Taussig R, Kustu S, Botstein D** (1983) The secreted form of invertase in *Saccharomyces cerevisiae* is synthesized from mRNA encoding a signal sequence. *Mol. Cell Biol.* **3**:439-447.
- Carlson M, Celenza JL, Eng FJ** (1985) Evolution of the dispersed SUC gene family of *Saccharomyces* by rearrangements of chromosome telomeres. *Mol. Cell Biol.* **5**:2894-2902.
- Chambert R, Petit-Glatron MF** (1991) Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **279**:35-41.

- Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, Limaye AP, Cookson BT** (2000) Identification of Medically Important Yeasts Using PCR-Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer 2 Region of the rRNA Genes. *J.Clin.Microbiol.* **38**:2302-2310.
- Cherbut C, Michel C, Lecannu G** (2003) The prebiotic characteristics of fructooligosaccharides are necessary for reduction of TNBS-induced colitis in rats. *J.Nutr.* **133**:21-27.
- Chien CS, Lee WC, Lin TJ** (2001) Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology* **29**:252-257.
- Chow J** (2002) Probiotics and prebiotics: A brief overview. *J.Ren Nutr.* **12**:76-86.
- Chu FK, Watorek W, Maley F** (1983) Factors affecting the oligomeric structure of yeast external invertase. *Arch.Biochem.Biophys.* **223**:543-555.
- Chu WS, Magee BB, Magee PT** (1993) Construction of an SfiI macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J.Bacteriol.* **175**:6637-6651.
- Chuankhayan P, Hsieh CY, Huang YC, Hsieh YY, Guan HH, Hsieh YC, Tien YC, Chen CD, Chiang CM, Chen CJ** (2010) Crystal Structures of *Aspergillus japonicus* Fructosyltransferase Complex with Donor/Acceptor Substrates Reveal Complete Subsites in the Active Site for Catalysis. *J.Biol.Chem.* **285**:23251-23264.
- Collins ME and Rastall RA** (2008) Oligosaccharides in Food and Agriculture. In Glycoscience, B.O.Fraser-Reid, K.Tatsuta, and J.Thiem, eds (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1185-1204.
- Combes D, Monsan P** (1983) Sucrose hydrolysis by invertase. Characterization of products and substrate inhibition. *Carbohydrate Research* **117**:215-228.
- Coussement PAA** (1999) Inulin and Oligofructose: Safe Intakes and Legal Status. *J.Nutr.* **129**:1412.

- Coutinho PM and Henrissat B** (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*, H.J.Gilbert, G.Davies, B.Henrissat, and B.Svensson, eds (The Royal Society of Chemistry,Cambridge), pp. 3-12.
- Crespo-Sempere A, González-Candelas L, Martínez-Culebras PV** (2010) Genes differentially expressed by *Aspergillus carbonarius* strains under ochratoxin A producing conditions. *International Journal of Food Microbiology* **142**:170-179.
- Crittenden RG, Playne MJ** (1996) Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology* **7**:353-361.
- Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT** (1987) Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*. **28**:1221-1227.
- Daniel H-M, Meyer W** (2003) Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology* **86**:61-78.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M** (2000) Ghrelin, a Novel Growth Hormone-Releasing Acylated Peptide, Is Synthesized in a Distinct Endocrine Cell Type in the Gastrointestinal Tracts of Rats and Humans. *Endocrinology* **141**:4255-4261.
- Davies G, Henrissat B** (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**:853-859.
- Davies GJ, Wilson KS, Henrissat B** (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem.J.* **321**:557-559.
- del Castillo L, Nieto SA, Sentandreu R** (1992) Differential expression of the invertase-encoding SUC genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. **120**:59-65.
- Delzenne NM, Daubioul C, Neyrinck A, Lasa M, Taper HS** (2002) Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. *Br.J.Nutr.* **87**:S255-S259.

- Delzenne NM** (2003) Oligosaccharides: state of the art. *Proc.Nutr.Soc.* **62**:177-182.
- Delzenne NM, Cani PD, Daubioul C, Neyrinck AM** (2005) Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. *Br.J Nutr.* **93**:S157-S161.
- Demeulle S, Guiraud JP, Galzy P** (1981) Study of inulase from *Debaryomyces phaffii* Capriotti. *Z.Allg.Mikrobiol.* **21**:181-189.
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O** (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucl.Acids Res.* **36**:W465-W469.
- Diplock AT, Aggett PA, Ashwell M, Bornet F, Fern EB, Roberfroid MB** (1999) Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. *Br.J.Nutr.* **81**:S1-27.
- Dodik F, Rothstein A** (1964) Factors influencing the appearance of invertase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch.Biochem.Biophys.* **104**:478-486.
- Dover GA, Strachan T, Coen ES, Brown SD** (1982) Molecular drive. *Science.* **218**:1069.
- Drucker DJ** (2002) Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. *Gastroenterology.* **122**:531-544.
- Edelman J, Jeeord TG** (1968) The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist* **67**:517-531.
- Elias I, Lagergren J** (2007) Fast computation of distance estimators. *BMC Bioinformatics* **8**:89.
- Espinosa, M C** (2006) Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Tesis doctoral. Universidad de Cádiz.
- Faijes M, Perez X, Perez O, Planas A** (2003) Glycosynthase activity of *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4-beta-glucanase mutants: specificity, kinetics, and mechanism. *Biochemistry.* **42**:13304-13318.

- Fanaro S, Boehm G, Garssen J, Knol J, Mosca F, Stahl B, Vigi V** (2005) Galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides as prebiotics in infant formulas: a review. *Acta Paediatr.Suppl.* **94**:22-26.
- FAOSTAT** (2008) <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx>.
- Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A** (2000) Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**:1351-1371.
- Felsenstein J** (1989) *PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2)*. *Cladistics* **5**:164-166.
- Fonseca G, Heinzle E, Wittmann C, Gombert A** (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* **79**:339-354.
- Franck A and de Leenheer L** (2005) Inulin. In *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry: Properties, Production, and Patents*, A.Steinbüchel and S.K.Rhee, eds (Wiley-VCH), pp. 281-322.
- Gascon S, Lampen JO** (1968) Purification of the internal invertase of yeast. *J.Biol.Chem.* **243**:1567-1572.
- Gascon S, Neumann NP, Lampen JO** (1968) Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *J.Biol.Chem.* **243**:1573-1577.
- Gascuel O** (1997) BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* **14**:685-695.
- Gebler J, Gilkes NR, Claeysens M, Wilson DB, Beguin P, Wakarchuk WW, Kilburn DG, Miller RC, Jr., Warren RA, Withers SG** (1992) Stereoselective hydrolysis catalyzed by related beta-1,4-glucanases and beta-1,4-xylanases. *J.Biol.Chem.* **267**:12559-12561.
- Gibson GR, Beatty ER, Wang X, Cummings JH** (1995) Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*. **108**:975-982.

- Gibson GR, Roberfroid MB** (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J.Nutr.* **125**:1401-1412.
- Goetz M, Roitsch T** (1999) The different pH optima and substrate specificities of extracellular and vacuolar invertases from plants are determined by a single amino-acid substitution. *Plant Journal* **20**:707.
- Goosen C, Yuan XL, van Munster JM, Ram AF, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L** (2007) Molecular and biochemical characterization of a novel intracellular invertase from *Aspergillus niger* with transfructosylating activity. *Eukaryot.Cell.* **6**:674-681.
- Gozalbo D, del Castillo Agudo L** (1994) Differential expression of SUC genes: A question of bases. *FEMS Microbiology Reviews* **15**:1-7.
- Guarner F** (2005) Inulin and oligofructose: impact on intestinal diseases and disorders. *Br.J Nutr.* **93**:S61-S65.
- Guex N, Peitsch MC** (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* **18**:2714-2723.
- Guo H, Xiong J** (2006) A specific and versatile genome walking technique. *Gene* **381**:18-23.
- Hall TA** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.Ser.(Oxf).*:95-98.
- Hemsley A, Arnheim N, Toney MD, Cortopassi G, Galas DJ** (1989) A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucl.Acids Res.* **17**:6545-6551.
- Henrissat B** (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem.J.* **280**:309-316.
- Henrissat B, Davies G** (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology* **7**:637-644.
- Henry GAF and Wallace RK** (1993) The Origin, Distribution and Evolutionary Significance of Fructans. In Science and Technology of Fructans. Suzuki M., Chatterton N.J eds. (CRC Press), pp. 119-140.

- Hidaka H, Hirayama M, Sumi N** (1988) A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric.Biol.Chem.* **52**:1181-1187.
- Hincha DK, Hellwege EM, Heyer AG, Crowe JH** (2000) Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. *Eur.J.Biochem.* **267**:535-540.
- Homann A, Biedendieck R, Gotze S, Jahn D, Seibel J** (2007) Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem.J.* **407**:189-198.
- James SA, Carvajal Barriga EJ, Bond CJ, Cross K, Nunez NC, Portero PB, Roberts IN** (2009) *Candida carvajalis* sp. nov., an ascomycetous yeast species from the Ecuadorian Amazon jungle. *FEMS Yeast Res.* **9**:784-788.
- Kelly G** (2008) Inulin-type prebiotics - a review: part 1. *Altern.Med.Rev.* **13**:315-329.
- Kopp J, Schwede T** (2004) The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. *Nucleic Acids Res.* **32**:D230-D234.
- Koshland DE Jr, Stein SS** (1954) Correlation of bond breaking with enzyme specificity. Cleavage point of invertase. *J.Biol.Chem.* **208**:139-148.
- Kralj S, Buchholz K, Dijkhuizen L, Seibel J** (2008) Fructansucrase enzymes and sucrose analogues: A new approach for the synthesis of unique fructo-oligosaccharides. *Biocatalysis and Biotransformation* **26**:32-41.
- Kruse HP, Kleessen B, Blaut M** (1999) Effects of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects. *British Journal of Nutrition* **82**:375-382.
- Kurakake M, Onoue T, Komaki T** (1996) Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by beta-fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **45**:236-239.
- Kurtzman CP, Robnett CJ** (1997) Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J.Clin.Microbiol.* **35**:1216-1223.

- Kurtzman CP, Robnett CJ** (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**:331-371.
- Kurtzman CP, Robnett CJ, Basehoar-Powers E** (2008) Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Res.* **8**:939-954.
- L'Hocine L, Wang Z, Jiang B, Xu S** (2000) Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. *Journal of Biotechnology* **81**:73-84.
- Lammens W, Le Roy K, Schroeven L, Van Laere A, Rabijns A, Van den Ende W** (2009) Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *J.Exp.Bot.* **60**:727-740.
- Laparra JM, Sanz Y** (2010) Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. *J Cell Biochem.* **109**:801-807.
- Lara-Villoslada F, de Haro O, Camuesco D, Comalada M, Velasco J, Zarzuelo A, Xaus J, Galvez J** (2006) Short-chain fructooligosaccharides, in spite of being fermented in the upper part of the large intestine, have anti-inflammatory activity in the TNBS model of colitis. *Eur.J.Nutr.* **45**:418-425.
- Lasseur B, Schroeven L, Lammens W, Le RK, Spangenberg G, Manduzio H, Vergauwen R, Lothier J, Prud'homme MP, Van den Ende W** (2009) Transforming a fructan:fructan 6G-fructosyltransferase from perennial ryegrass into a sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase. *Plant Physiol.* **149**:327-339.
- Latorre-Garcia L, del Castillo-Agudo L, Polaina J** (2007) Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**:785-791.

- Le Roy K, Lammens W, Verhaest M, De Coninck B, Rabijns A, Van Laere A, Van den Ende W** (2007) Unraveling the Difference between Invertases and Fructan Exohydrolases: A Single Amino Acid (Asp-239) Substitution Transforms Arabidopsis Cell Wall Invertase1 into a Fructan 1-Exohydrolase. *Plant Physiol.* **145**:616-625.
- Le RK, Verhaest M, Rabijns A, Clerens S, Van LA, Van den Ende W** (2007) N-glycosylation affects substrate specificity of chicory fructan 1-exohydrolase: evidence for the presence of an inulin binding cleft. *New Phytol.* **176**:317-324.
- Lee SS, Yu S, Withers SG** (2003) Detailed dissection of a new mechanism for glycoside cleavage: alpha-1,4-glucan lyase. *Biochemistry.* **42**:13081-13090.
- Li SC, Goto NK, Williams KA, Deber CM** (1996) Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:6676-6681.
- Lindsay JO, Whelan K, Stagg AJ, Gobin P, Al-Hassi HO, Rayment N, Kamm MA, Knight SC, Forbes A** (2006) Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut.* **55**:348-355.
- Link AJ, Olson MV** (1991) Physical Map of the *Saccharomyces cerevisiae* Genome at 110-Kilobase Resolution. *Genetics* **127**:681-698.
- Litvak DA, Evers BM, Hwang KO, Hellmich MR, Ko TC, Townsend CM, Jr.** (1998) Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21Waf1/Cip1 and p27Kip1. *Surgery.* **124**:161-169.
- Lu HZ, Cai Y, Wu ZW, Jia JH, Bai FY** (2004a) *Kazachstania aerobia* sp. nov., an ascomycetous yeast species from aerobically deteriorating corn silage. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**:2431-2435.
- Lu HZ, Jia JH, Wang QM, Bai FY** (2004b) *Candida asparagi* sp. nov., *Candida diospyri* sp. nov. and *Candida qinlingensis* sp. nov., novel anamorphic, ascomycetous yeast species. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**:1409-1414.

- Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I, Philpott-Howard J, Bjarnason I** (1996) Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut*. **38**:365-375.
- Maiorano AE, Piccoli RM, da Silva ES, de Andrade Rodrigues MF** (2008) Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. *Biotechnol.Lett.* **30**:1867-1877.
- Manning TS, Gibson GR** (2004) Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **18**:287-298.
- Marín-Navarro J, Gurgu L, Alamar S, Polaina J** (2011) Structural and functional analysis of hybrid enzymes generated by domain shuffling between *Saccharomyces cerevisiae* (var. diastaticus), Sta1 glucoamylase and *Saccharomycopsis fibuligera* Bgl1 b-glucosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**:121-130.
- Marx SP, Winkler S, Hartmeier W** (2000) Metabolization of beta-(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters* **182**:163-169.
- Meng G, Futterer K** (2003) Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat Struct.Biol.* **10**:935-941.
- Mitsuoka T, Hidaka H, Eida T** (1987) Effect of fructo-oligosaccharides on intestinal microflora. *Nahrung*. **31**:427-436.
- Moore WE, Holdeman LV** (1974) Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl.Microbiol.* **27**:961-979.
- Mortensen PB, Clausen MR** (1996) Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand.J.Gastroenterol.Suppl.* **216**:132-148.
- Mortimer RK, Johnston JR** (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**:35-43.
- Muller H, Thierry A, Coppee JY, Gouyette C, Hennequin C, Sismeiro O, Talla E, Dujon B, Fairhead C** (2009) Genomic polymorphism in the population of *Candida glabrata*: gene copy-number variation and chromosomal translocations. *Fungal.Genet.Biol.* **46**:264-276.

- Nakakuki T** (2005) Present status and future prospects of functional oligosacchride development in Japan. *Journal of Applied Glycoscience* **52**:267-271.
- Naumoff DG** (2001) beta-fructosidase superfamily: homology with some alpha-L-arabinases and beta-D-xylosidases. *Proteins*. **42**:66-76.
- Nguyen QD, Mattes F, Hoschke A, Rezessy-szabó J, Mahalingeshwara KB** (1999) Production, purification and identification of fructooligosaccharides produced by b-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI 303386. *Biotechnology Letters* **21**:183-186.
- Nguyen QD, Rezessy-Szabó JM, Bhat MK, Hoschke A** (2005) Purification and some properties of beta-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. *Process Biochemistry* **40**:2461-2466.
- Niness KR** (1999) Inulin and Oligofructose: What Are They? *J.Nutr.* **129**:1402.
- Ozimek LK, Kralj S, Kaper T, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L** (2006) Single amino acid residue changes in subsite -1 of inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121 strongly influence the size of products synthesized. *FEBS J.* **273**:4104-4113.
- Painbeni E, Valles S, Polaina J, Flors A** (1992) Purification and characterization of a *Bacillus polymyxa* beta-glucosidase expressed in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **174**:3087-3091.
- Peitsch MC** (1995) Protein Modeling by E-mail. *Nat Biotech* **13**:658-660.
- Pereira DI, Gibson GR** (2002) Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.* **37**:259-281.
- Perkins TD and van den Berg AK** (2009) Maple Syrup-Production, Composition, Chemistry, and Sensory Characteristics. In *Advances in Food and Nutrition Research*, L.T.Steve, ed (Academic Press), pp. 101-143.
- Perlman D, Halvorson HO** (1981) Distinct repressible mRNAs for cytoplasmic and secreted yeast invertase are encoded by a single gene. *Cell.* **25**:525-536.

- Perlman D, Halvorson HO, Cannon LE** (1982) Presecretory and cytoplasmic invertase polypeptides encoded by distinct mRNAs derived from the same structural gene differ by a signal sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **79**:781-785.
- Peterson SW, Kurtzman CP** (1991) Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *Syst.Appl.Microbiol.* **14**:124-129.
- Polaina J, Adam AC** (1991) A fast procedure for yeast DNA purification. *Nucl.Acids Res.* **19**:5443.
- Polo A, Alvaro-Benito M, Fernandez-Lobato M, Sanz-Aparicio J** (2009) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis*. *Acta Crystallogr.Sect.F.Struct.Biol Cryst.Comm.* **65**:1162-1165.
- Pons T, Hernandez L, Batista FR, Chinea G** (2000) Prediction of a common beta-propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity. *Protein Sci.* **9**:2285-2291.
- Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, Gapstur SM** (1993) Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol.Rev.* **15**:499-545.
- Radford A** (1993) A fungal phylogeny based upon orotidine 5-monophosphate decarboxylase. *Journal of Molecular Evolution* **36**:389-395.
- Ramos-alvarez M, Sabin AB** (1956) Intestinal viral flora of healthy children demonstrable by monkey kidney tissue culture. *Am J Public Health Nations.Health.* **46**:295-299.
- Reddy AV, MacColl R, Maley F** (1990) Effect of oligosaccharides and chloride on the oligomeric structures of external, internal, and deglycosylated invertase. *Biochemistry.* **29**:2482-2487.
- Reddy VA, Maley F** (1990) Identification of an active-site residue in yeast invertase by affinity labeling and site-directed mutagenesis. *J.Biol.Chem.* **265**:10817-10820.
- Reddy A, Maley F** (1996) Studies on Identifying the Catalytic Role of Glu-204 in the Active Site of Yeast Invertase. *J.Biol.Chem.* **271**:13953-13958.

- Rehm J, Willmitzer L, Heyer AG** (1998) Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. *J.Bacteriol.* **180**:1305-1310.
- Requena Rolanía T, Peláez Martínez C, Guijarro Herráiz C, Velasco Arribas M** (2009) Alimentos probióticos y salud intestinal. *ALIM.NUTRI.SALUD* **16**:47-53.
- Ritsema T, Smeekens SC** (2003) Engineering fructan metabolism in plants. *J Plant Physiol* **160**:811-820.
- Ritsema T, Verhaar A, Vijn I, Smeekens S** (2004) Fructosyltransferase mutants specify a function for the beta-fructosidase motif of the sucrose-binding box in specifying the fructan type synthesized. *Plant Mol.Biol.* **54**:853-863.
- Ritsema T, Hernandez L, Verhaar A, Altenbach D, Boller T, Wiemken A, Smeekens S** (2006) Developing fructan-synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose-binding box. *Plant J.* **48**:228-237.
- Roberfroid MB** (1993) Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Crit Rev.Food Sci.Nutr.* **33**:103-148.
- Roberfroid MB, Van Loo JA, Gibson GR** (1998) The Bifidogenic Nature of Chicory Inulin and Its Hydrolysis Products. *J.Nutr.* **128**:11-19.
- Roberfroid MB, Slavin J** (2000) Nondigestible oligosaccharides. *Crit Rev.Food Sci.Nutr.* **40**:461-480.
- Roberfroid MB** (2005) Introducing inulin-type fructans. *Br.J.Nutr.* **93**:S13-S25.
- Roberfroid MB** (2007a) Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J.Nutr.* **137**:2493S-2502S.
- Roberfroid MB** (2007b) Prebiotics: the concept revisited. *J.Nutr.* **137**:830S-837S.
- Rodríguez Gómez JM** (2009) Nuestra otra "vida interior": de la microbiota intestinal al metagenoma humano. *ALIM.NUTRI.SALUD* **16**:16-22.

- Roy A, Kucukural A, Zhang Y** (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat.Protocols* **5**:725-738.
- Sabater-Molina M, Larqué E, Torrella F, Zamora S** (2009) Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry* **65**:315-328.
- Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T** (2002) Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides*. **23**:531-536.
- Samarawira I** (1983) Date palm, potential source for refined sugar. *Economic Botany* **37**:181-186.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. (NY Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sangeetha PT, Ramesh MN, Prapulla SG** (2005) Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology* **16**:442-457.
- Santos AMP, Maugeri F** (2007) Synthesis of fructooligosaccharides from sucrose using inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. *Food Technol.Biotechnol* **45**:181-186.
- Sanz-Aparicio J, Hermoso JA, Martinez-Ripoll M, Gonzalez B, Lopez-Camacho C, Polaina J** (1998) Structural basis of increased resistance to thermal denaturation induced by single amino acid substitution in the sequence of beta-glucosidase A from *Bacillus polymyxa*. *Proteins*. **33**:567-576.
- Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Zwahlen MC, Desiere F, Bork P, Delley M, Pridmore RD, Arigoni F** (2002) The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **99**:14422-14427.
- Schroeven L, Lammens W, Van LA, Van den Ende W** (2008) Transforming wheat vacuolar invertase into a high affinity sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase. *New Phytol.* **180**:822-831.

- Schwartz DC, Cantor CR** (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. **37**:67-75.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC** (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* **31**:3381-3385.
- Schwede T, Sali A, Eswar N, and Peitsch MC** (2008) Protein Structure Modeling. In Computational Structural Biology, T.Schwede and M.C.Peitsch, eds (5 Toh Tuck Link, Singapore 596224: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.), pp. 3-35.
- Shamsir MS, Dalby AR** (2007) Beta-sheet containment by flanking prolines: molecular dynamic simulations of the inhibition of beta-sheet elongation by proline residues in human prion protein. *Biophys.J.* **92**:2080-2089.
- Shibata R, Kimura M, Takahashi H, Mikami K, Aiba Y, Takeda H, Koga Y** (2009) Clinical effects of kestose, a prebiotic oligosaccharide, on the treatment of atopic dermatitis in infants. *Clin Exp.Allergy*. **39**:1397-1403.
- Sor F, Fukuhara H** (1989) Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces*. *Yeast*. **5**:1-10.
- Steinbüchel A** (2002) Inulin. In Biopolymers, (Weinheim, Germany: Wiley - VCH,), pp. 439-479.
- Steinhoff U** (2005) Who controls the crowd? New findings and old questions about the intestinal microflora. *Immunology Letters* **99**:12-16.
- Sturm A** (1999) Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol.* **121**:1-8.
- Sturm A, Tang GQ** (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* **4**:401-407.
- Suh SO, Blackwell M** (2004) Three new beetle-associated yeast species in the *Pichia guilliermondii* clade. *FEMS Yeast Res.* **5**:87-95.

- Takegawa K and Fan JQ** (2003) Enzymatic Synthesis of Neoglycoconjugates by Transglycosylation with Endo-beta-N-acetylglucosaminidase A. In *Methods in Enzymology. Recognition of Carbohydrates in Biological Systems, Part A: General Procedures*, C.L.Yuan and T.L.Reiko, eds (Academic Press), pp. 64-74.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol.Biol.Evol.* **24**:1596-1599.
- Tokunaga T, Nakada Y, Tashiro Y, Hirayama M, Hidaka H** (1993) Effects of fructooligosaccharides intake on the intestinal microflora and defecation in healthy volunteers. *Bifidus* **6**:143-150.
- Tokunaga T** (2004) Novel physiological function of fructooligosaccharides. *Biofactors*. **21**:89-94.
- Trock B, Lanza E, Greenwald P** (1990) Dietary Fiber, Vegetables, and Colon Cancer: Critical Review and Meta-analyses of the Epidemiologic Evidence. *J.Natl.Cancer Inst.* **82**:650-661.
- Vacharaksa A, Finlay BB** (2010) Gut Microbiota: Metagenomics to Study Complex Ecology. *Current Biology* **20**:R569-R571.
- Van den Ende W, Michiels A, De Roy J, Van Laere A** (2002) Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. *ScientificWorldJournal*. **2**:1281-1295.
- Van den Ende W, Lammens W, Van Laere A, Schroeve L, Le Roy K** (2009) Donor and acceptor substrate selectivity among plant glycoside hydrolase family 32 enzymes. *FEBS J.* **276**:5788-5798.
- Van Loo J, Coussement P, de Leenheer L, Hoebregs H, Smits G** (1995) On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit Rev.Food Sci Nutr.* **35**:525-552.
- Vergauwen R, Van den Ende W, Van Laere A** (2000) The role of fructan in flowering of *Campanula rapunculoides*. *J.Exp.Bot.* **51**:1261-1266.

- Verhaest M, Van den Ende W, Le Roy K, De Ranter CJ, Van Laere A, Rabijns A** (2005) X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*. *Plant J.* **41**:400-411.
- Videla S, Vilaseca J, Antolin M, Garcia-Lafuente A, Guarner F, Crespo E, Casalots J, Salas A, Malagelada JR** (2001) Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. *Am.J.Gastroenterol.* **96**:1486-1493.
- Waclawovsky AJ, Sato PM, Lembke CG, Moore PH, Souza GM** (2010) Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotechnology Journal* **8**:263-276.
- Wang QM, Li J, Wang SA, Bai FY** (2008) Rapid differentiation of phenotypically similar yeast species by single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA. *Appl.Environ.Microbiol.* **74**:2604-2611.
- Wang S, Liu J, Li L, Wice BM** (2004) Individual Subtypes of Enteroendocrine Cells in the Mouse Small Intestine Exhibit Unique Patterns of Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptor Expression. *J.Histochem.Cytochem.* **52**:53-64.
- Wang X-D, Rakshit SK** (2000) Iso-oligosaccharide production by multiple forms of transferase enzymes from *Aspergillus foetidus*. *Process Biochemistry* **35**:771-775.
- Watzl B, Girrbach S, Roller M** (2005) Inulin, oligofructose and immunomodulation. *Br.J Nutr.* **93**:S49-S55.
- Williams RS, Trumbly RJ, MacColl R, Trimble RB, Maley F** (1985) Comparative properties of amplified external and internal invertase from the yeast SUC2 gene. *J.Biol.Chem.* **260**:13334-13341.
- Wu ZW, Robert V, Bai FY** (2006) Genetic diversity of the *Pichia membranifaciens* strains revealed from rRNA gene sequencing and electrophoretic karyotyping, and the proposal of *Candida californica* comb. nov. *FEMS Yeast Res.* **6**:305-311.
- Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S** (2005) Appetite control. *J Endocrinol* **184**:291-318.

- Yarrow D** (1998) Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In *The Yeasts, a Taxonomy Study*, C.P.Kurtzman and J.W.Fell, eds (Elsevier, Amsterdam), pp. 77-100.
- Yun JW** (1996) Fructooligosaccharides-Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology* **19**:107-117.
- Zhang Y** (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC.Bioinformatics*. **9**:40.
- Zhang Y** (2009) I-TASSER: fully automated protein structure prediction in CASP8. *Proteins*. **77**:100-113.

APÉNDICE

Tabla de los 20 aminoácidos esenciales donde se representa su estructura química.

Aminoácidos con cadena lateral cargada				
Positiva			Negativa	
Arginina (Arg, R)	Histidina (His, H)	Lisina (Lys, L)	Aspártico (Asp, D)	Glutámico (Glu, E)
$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH_2 CH_2 CH_2 NH C=NH NH_2	$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH_2 C / \ $\text{N} \quad \text{CH}$ \ / $\text{HC} \quad \text{NH}$	$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH_2 CH_2 CH_2 CH_2 NH_2	$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH_2 COOH	$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH_2 CH_2 COOH

Aminoácidos con cadena lateral polar				
Serina (Ser, S)	Treonina (Thr, T)	Asparagina (Asn, N)	Glutamina (Gln, Q)	Cisteína (Cys, C)
$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH_2 OH	$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH-OH CH_3	$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH_2 C=O NH_2	$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH_2 CH_2 C=O NH_2	$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH_2 SH

Aminoácidos con cadena lateral apolar				
Glicina (Gly, G)	Alanina (Ala, A)	Valina (Val, V)	Leucina (Leu, L)	Isoleucina (Ile, I)
$\text{NH}_2\text{---CH}_2\text{---COOH}$	$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH_3	$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH / \ $\text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3$	$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH_2 CH / \ $\text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3$	$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH-CH_3 CH_2 CH_3
Metionina (Met, M)	Prolina (Pro, P)	Triptófano (Trp, W)	Fenilalanina (Phe, F)	Tirosina (Tyr, Y)
$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH_2 CH_2 S CH_3	HN---CH---COOH \ / $\text{CH}_2 \quad \text{CH}_2$ C H_2	$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH_2 C=CH \ / $\text{C} \quad \text{NH}$ / \ $\text{HC} \quad \text{C}$ \ / $\text{C} \quad \text{CH}$ \ / $\text{H} \quad \text{H}$	$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH_2 C / \ $\text{HC} \quad \text{CH}$ \ / $\text{HC} \quad \text{CH}$ H	$\text{NH}_2\text{---CH---COOH}$ CH_2 C / \ $\text{HC} \quad \text{CH}$ \ / $\text{HC} \quad \text{CH}$ C OH

